



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
Núcleo de Ciências e Tecnologia
Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente

ESTUDOS DE BIODEGRADAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DERIVADOS
DE PETRÓLEO, PRESENTES EM DIESEL E GASOLINA , POR CONSÓRCIOS DE
MICRORGANISMOS COLETADOS NO BAIRRO NACIONAL, PORTO VELHO-RO

CLEBER CALADO LUZ

Porto Velho (RO)
2009

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
Núcleo de Ciências e Tecnologia

**ESTUDOS DE BIODEGRADAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DERIVADOS
DE PETRÓLEO, PRESENTES EM DIESEL E GASOLINA, POR CONSÓRCIOS DE
MICRORGANISMOS COLETADOS NO BAIRRO NACIONAL, PORTO VELHO-RO**

CLEBER CALADO LUZ

Orientadora: Dra. Mariza Gomes Reis
Coorientador: Prof. Dr. Gunther Brucha

Dissertação de Mestrado apresentada junto
ao Programa de Pós-Graduação em
Desenvolvimento Regional e Meio
Ambiente, Área de Concentração em.
Diagnóstico Ambiental e Biodiversidade,
para obtenção do Título de Mestre em
Desenvolvimento Regional e Meio
Ambiente.

Porto Velho (RO)
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

L979e Luz, Cleber Calado
Estudos de biodegradação de constituintes químicos derivados de petróleo, presentes em diesel e gasolina, por consórcios de microrganismos coletados no bairro Nacional, Porto Velho-RO/
Cleber Calado Luz. Orientadora Mariza Gomes Reis. – Porto Velho, 2009.
93 f.

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) Universidade Federal de Rondônia, 2009.

1. Derivados de petróleo – biodegradação – Porto Velho (RO) 2. Combustível – análise laboratoriais – Porto Velho (RO) 3. Derivados de petróleo - microrganismos – Porto Velho (RO) I. Título

CDU: 579.222(811.1Porto Velho)

Bibliotecária responsável: Luzimar Barbosa Chaves CRB 11-338

CLEBER CALADO LUZ

ESTUDOS DE BIODEGRADAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DERIVADOS
DE PETRÓLEO, PRESENTES EM DIESEL E GASOLINA, POR CONSÓRCIOS DE
MICRORGANISMOS COLETADOS NO BAIRRO NACIONAL, PORTO VELHO-RO

Comissão Examinadora

Porto Velho, _____ de _____ de _____

Resultado_____

*Dedicado a toda minha família,
principalmente, meus pais: Itamar e
Fátima.*

*A todos os meus amigos e pessoas que
me ajudaram direta ou indiretamente.*

A esses o meu muito obrigado!!!!

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e especialmente a minha querida Márcia pela paciência, apoio e compreensão.

A todo o grupo do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang C. Pfeiffer da Universidade Federal de Rondônia, em especial para os professores Wanderley, Mariza, Marlon, Miyuki, Gunther e Gil pela confiança e oportunidade concedida, além dos grandes ensinamentos.

A galera que sempre deu muita força, em especial ao Dario, Ronaldo, Jane, Darly, Cibeli, Igor, Alessandra, Roberta, Chê e Jai.

Aos colegas da Central Analítica, em especial a Leidiane e a Marília.

A todo o corpo docente do Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, em especial aos professores Mariângela, Maniesi, Walterlina e Vicente.

Aos colegas do Laboratório da FARO.

A todos os companheiros de mestrado da turma de 2007.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente.

A Deus, pela saúde para realização de mais uma etapa de minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

$\mu\text{g.L}^{-1}$ - micrograma por litro

μL - microlitro

μm – micrometro

BTXs - Benzeno, Tolueno, e isômeros do Xileno incluindo o Etilbenzeno

CG/FID - Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama

CG/MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CH_4 - Metano

CO_2 – dióxido de carbono

CW/DVB - *Carbowax*/Divinil Benzeno

C_x – hidrocarboneto. X corresponde ao n° de átomos de carbonos

g - grama

g.L^{-1} - gramas por litro

g.mol^{-1} - gramas por mol

g/cm^3 - gramas por centímetro cúbico

h - hora

H_2O - água

HS - *headspace*

Hz - Hertz

m/z – razão massa carga

mg - miligrama

mg.L^{-1} - miligrama por litro

min - minuto

mol.L^{-1} – mol por litro

NTU - Unidade de Turbidimetria Nefelometrica

pH - Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações por minutos

SPME – MicroExtração em Fase Sólida.

UCM – Mistura complexa não resolvida

LISTA DE TABELAS

	Pg
Tabela 1. Composição do Petróleo.....	17
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos compostos BTXs.....	20
Tabela 3. Relação da quantidade de postos de combustíveis por regiões brasileiras.....	21
Tabela 4. Padrões de Lançamento para os compostos BTXs.....	35
Tabela 5. Volume dos reagentes para a PCR.....	58
Tabela 6. Análise de componentes principais dos dados de diesel.....	64
Tabela 7. Relação dos compostos identificados no <i>headspace</i> dos ensaios com diesel por espectrometria de massa.....	68
Tabela 8. Leitura da Concentração do Produto de PCR purificado.....	69
Tabela 9. Identificação molecular das culturas isoladas, tendo como tamanho da sequência 1400 pares de base (pb).....	70
Tabela 10. Relação dos compostos identificados no <i>headspace</i> dos ensaios com gasolina por espectrometria de massa.....	80

LISTA DE FIGURAS

	Pg
Figura 1. Classificação dos hidrocarbonetos.....	19
Figura 2. Vazamento de um tanque de armazenamento de combustível.....	20
Figura 3. Esquema da degradação de alcanos por bactérias gran-negativas.....	26
Figura 4. Vias metabólicas de degradação de n-alcanos.....	30
Figura 5. Degradação inicial do benzeno: (a) Formação do catecol e (b) Formação do protocatecolato.....	31
Figura 6. Clivagem do anel aromático: (a) Ortoclivagem e (b) metaclivagem.....	32
Figura 7. Classificação das técnicas de extração.....	38
Figura 8. Determinador de gordura soxhlet modelo Te-004.....	39
Figura 9. Conjunto comercial de fibra de SPME.....	40
Figura 10. Fibras de SPME.....	41
Figura 11. Esquema de um aplicador comercial utilizado em SPME.....	42
Figura 12. Aplicador comercial utilizado em SPME.....	42
Figura 13. Procedimento básico para Microextração em Fase Sólida.....	44
Figura 14. Modos de extração utilizados em SPME.....	46
Figura 15. Área de estudo.....	51
Figura 16. Meios de cultura.....	53
Figura 17. Medidas de crescimento dos microrganismos a 600 nm.....	60
Figura 18. Perfis cromatográficos dos ensaios (meio de cultura com microrganismo) e controle (meio de cultura estéril).....	62
Figura 19. Perfis cromatográficos dos ensaios dando destaque par os hidrocarbonetos de série homóloga e a formação de UCM do grupo experimento.....	63
Figura 20. Escores oriundos da Análise de Componentes dos dados de diesel.....	64
Figure 21. Loadings oriundos da Análise de Componentes dos dados de diesel.....	65
Figura 22. Perfil cromatográfico da biodegradação de diesel a 1000 ppm por CG/MS.....	66
Figura 23. Perfil cromatográfico referente ao monitoramento do 21 ^o dia da biodegradação de diesel a 1000 ppm.....	67
Figura 24. Placa de cultura microbiana D-1 (a) e Placa de cultura microbiana D-2 (b).....	69
Figura 25. Gel do produto da PCR purificado.....	70
Figura 26. Cromatograma do Monitoramento do 15 ^o dia da biodegradação de gasolina a	

1000 ppm.....	72
Figura 27. Monitoramento do processo de biodegradação de gasolina, 3, 8 e 15 dias.....	73
Figura 28. Perfil cromatográfico referente ao monitoramento do 3º dia da biodegradação de gasolina a 1000 ppm.....	74
Figura 29. Espectro de massas de quatro n-alcenos presentes na fração volátil da gasolina estudada.....	76
Figura 30. Espectro de massas de alguns compostos poliaromáticos presentes na fração volátil da gasolina estudada com as respectivas estruturas.....	77
Figura 31. Mecanismo de fragmentação do 2,3- (e 1,2-)-dimetil-naftaleno e 1-(e 2-)-etil-naftaleno.....	78
Figura 32. Rearranjo para formação do cátion tropílio.....	78
Figura 33. Espectro de massas do nor-pristano (a) e pristano (b).....	79
Figura 34. Origem dos fragmentos observados nos espectros de massas do nor-pristano e do pristano.....	80

RESUMO

Neste trabalho foi investigado o potencial de biodegradação de gasolina e diesel por um consórcio de microrganismos proveniente de amostras de água residuária coletada nas proximidades de uma distribuidora de combustíveis no bairro Nacional em Porto Velho – RO. Os experimentos foram realizados em laboratório com concentração inicial de 1000 ppm, monitorados por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama ao longo de 15 e 21 dias para gasolina e diesel, respectivamente. Os cromatogramas obtidos foram investigados através de Análise por Componentes Principais, que revelou as tendências de degradação. Os componentes biodegradados e recalcitrantes foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A partir deste consórcio foram isoladas 5 cepas que participaram da biodegradação do diesel, sendo todas identificadas como *Acinetobacter Baumannii*. Os resultados revelaram o desaparecimento dos componentes da gasolina e do diesel. A partir destas análises foi observado que o consórcio degrada inicialmente hidrocarbonetos lineares e posteriormente, compostos aromáticos alquilados. Os resultados obtidos indicam que este consórcio e o microrganismo isolado pode ser utilizado em processos de biodegradação de derivados de petróleo como diesel e gasolina pelo processo de bioaumento na região de Porto Velho - RO para recuperação de áreas impactadas.

Palavras-chave: Biodegradação; Derivados de Petróleo; CG/MS; CG-FID; SPME

ABSTRACT

This study investigated the degradation potential of gasoline and diesel by a consortium of microorganisms collected in the Nacional district in Porto Velho – RO. The experiments were conducted in the laboratory with initial concentration of 1000 ppm and monitored by gas chromatography – flame ionization through a period of 15 and 21 days, for gasoline and diesel, respectively. The resulting chromatograms were investigated by Principal Components Analysis, which identified the biodegradation patterns. The degraded and recalcitrant compounds were identified by gas chromatography - mass spectrometry. Five lineages were isolated and identified as *Acinetobacter baumannii* from this consortium. The results showed the disappearance of gasoline components and of diesel components. They also showed that the consortium degrade initially linear hydrocarbons, followed by alkyl-aromatic compounds. These findings indicate that this consortium and isolated microorganisms can be used in the process of biodegradation of diesel and gasoline in the region of Porto Velho for the recovery of impacted areas.

Keywords: Biodegradation; Oil Derivatives; CG/MS; CG-/FID; /SPME

SUMÁRIO

	Pg
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Justificativa.....	16
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 O petróleo e seus derivados.....	17
2.1.1 A gasolina e o óleo diesel.....	18
2.2 Processos de descontaminação ambiental – Biodegradação.....	22
2.2.1 Degradação biótica.....	23
2.2.2 Acessibilidade dos poluentes aos microrganismos.....	24
2.2.3 Indução apropriada das enzimas biodegradativas.....	24
2.2.4 Disponibilidade de nutrientes inorgânicos.....	26
2.2.5 Condições físico-químicas envolvidas no processo de biodegradação.....	27
2.2.6 Aspectos bioquímicos da biodegradação de hidrocarbonetos.....	38
2.3 Toxicologia dos compostos BTXs.....	33
2.4 Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos.....	35
2.5 Métodos de avaliação da biodegradação em laboratório.....	37
2.6 Técnicas de extração: Microextração em Fase Sólida, SPME.....	38
2.6.1 Operação básica em SPME.....	43
2.6.2 Seleção dos Modos de Extração.....	45
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Geral.....	47
3.2 Específicos.....	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1 Materiais.....	48
4.1.1 Cromatógrafo.....	48
4.1.2 Microextração em Fase Sólida.....	49
4.1.3 Solventes, reagentes e vidrarias.....	49
4.1.4 Combustíveis.....	49
4.2 Métodos para o monitoramento do processo de biodegradação.....	50
4.2.1 Extração de compostos voláteis.....	50
4.2.1.1 Compostos voláteis apolares.....	50
4.2.1.2 Compostos voláteis polares.....	50
4.3 Extração de compostos não voláteis e semivoláteis.....	51
4.3.1 Extração líquido-líquido.....	51
4.4 Seleção de microrganismos capazes de degradar derivados de petróleo.....	51
4.4.1 Meio mineral inorgânico.....	52
4.4.2 Consórcios microbianos	52
4.5 Testes laboratoriais para avaliação da biodegradação.....	53
4.5.1 Diesel.....	53
4.5.2 Gasolina.....	53
4.6 Análise de dados.....	54
4.7 Isolamento e identificação molecular microbiana do consórcio (MCD ₇).....	55
4.7.1 Isolamento	55
4.7.2 Identificação molecular bacteriana.....	55
4.7.2.1 Extração de DNA genômico bacteriano.....	56

4.7.2.1.1 Soluções.....	56
4.7.2.1.1.1 Tampão TE (Tris-EDTA, 10 mM Tris-HCL, pH 8.0 e 1 mM EDTA, pH 8.0.....	56
4.7.2.1.1.2 Solução SDS 10 % (Dodecil Sulfato de Sódio).....	56
4.7.2.1.1.3 Solução CTAB 10 % (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio) NaCl 0,7 mol.L ⁻¹ ...	56
4.7.2.1.1.4 Solução proteinase K (20 mg/mL)	56
4.7.2.1.2 Procedimento.....	56
4.7.2.2 Medidas da concentração do DNA.....	57
4.7.2.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	57
4.7.2.3.1 Procedimento.....	57
4.7.2.4 Eletroforese	59
4.7.2.5 Purificações do produto de PCR e seqüenciamento das amostras.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 Obtenção dos consórcios microbianos.....	60
5.2 Estudos de biodegradação do diesel.....	61
5.2.1 Estudos de biodegradação de diesel monitorados por CG-FID.....	61
5.2.2 Estudos de biodegradação de diesel monitorados por CG/MS.....	65
5.2.3 Identificação dos compostos do diesel por espectrometria de massa (MS).....	67
5.3 Isolamento e identificação molecular microbiana do consórcio MCD ₇	69
5.4 Estudos de biodegradação da gasolina.....	71
5.4.1 Estudos de biodegradação de gasolina monitorados por CG-FID.....	72
5.4.2 Estudos de biodegradação de gasolina monitorados por CG/MS.....	74
5.4.3 Identificação dos compostos da gasolina por espectrometria de massa (MS).....	75
5.5 Investigação da formação de subprodutos durante o processo de biodegradação da gasolina	82
5.6 Investigação da potencialidade de um consórcio de microrganismo degradador de eugenol para degradar BTXs.....	83
6. CONCLUSÕES.....	84
7. SUGESTÕES.....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

Problemas associados com a qualidade da água própria para consumo são bem conhecidos e amplamente distribuídos pelo mundo. Atualmente, cerca de 1,2 milhões de pessoas sofrem com a falta de acesso a água apropriada para o consumo humano, 2,6 bilhões tem pouco ou nenhum saneamento básico e milhões de pessoas morrem anualmente por doenças transmitidas através da água, sendo as infecções parasitárias e diarreias as principais que levam ao agravamento da desnutrição (SHANNON et al, 2008). Além disso, um grande número de contaminantes são lançados diariamente em suplementos de água advindos da atividade humana, destacando-se metais pesados e derivados de petróleo, e os emergentes micropoluentes como disruptores endócrinos (SHANNON et al, 2008). Portanto, entre todos os problemas provocados pelo fenômeno de poluição ambiental, a contaminação das águas, e a conseqüente escassez de recursos hídricos de boa qualidade, é um dos mais importantes. Dentro deste contexto, a contaminação por petróleo e seus derivados tem causado bastante preocupação, seja pela frequência dos eventos ou pelo elevado potencial poluente dos mesmos. Destes, a gasolina e o óleo diesel merecem destaque, seja pela quantidade envolvida, ou pela periculosidade, verificada pela liberação de compostos com alta solubilidade em água que podem entrar em contato com a água subterrânea. No Brasil este problema com a gasolina acentua-se, pois a maioria dos tanques de armazenamento de combustíveis foram construídos na década de 70, e como a vida média destes tanques, estimada em 25 anos, pode-se esperar um aumento da ocorrência de vazamentos nos postos do país (CORSEUIL & MARTINS, 1997).

Dentre as atividades industriais, uma das que mais ameaçam o meio ambiente, também, é a atividade petrolífera. Em toda a sua cadeia produtiva há a possibilidade de contaminação do ar, das águas e dos solos por uma gama de compostos altamente poluentes. Frequentes ocorrências de derramamentos em solos brasileiros vêm motivando a realização de pesquisas na área de biorremediação de solos (SORIANO, 2000). Estatísticas mostram que no Brasil, atividades como: carga e descarga de petróleo e derivados, operações de lavagem de tanques de navios, tratamento de óleo entre outras, contribuem com 90% da poluição por hidrocarbonetos de petróleo. Acidentes com transportes contribuem com apenas 5 a 10% da poluição, porém a sua ocorrência é muito mais danosa ao meio ambiente, caso não seja controlada rapidamente (VITAL, 1992; URURAHY, 1998; URURAHY et al, 1998). A gasolina é constituída de uma mistura de hidrocarbonetos voláteis, cujos componentes maiores são cadeias ramificadas de

parafinas, cicloparafinas e compostos aromáticos, incluindo constituintes como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (denominados grupo BTXs), os quais representam os compostos mais solúveis e mais móveis encontrados na gasolina (POUSEN et al, 1992). Em um derramamento de gasolina, uma das principais preocupações é a contaminação de aquíferos que sejam usados como fonte de abastecimento de água para consumo humano, pois provocam danos à saúde devido à toxicidade.

De acordo com dados da organização *Conservation International*, estima-se que existam no Brasil cerca de 136 mil espécies de bactérias (13,6 % do total mundial) (LEWINSHON & PRADO, 2000), e com base na informação de que microrganismos podem degradar hidrocarbonetos, realizam-se cada vez mais estudos que visam o desenvolvimento de tecnologias que se utilizam dos mesmos para descontaminação de áreas ambientais afetadas. E devido à elevada diversidade de compostos presentes no petróleo, estudos de biorremediação de ambientes contaminados por este material e seus derivados, tornam-se necessários, visto que se pode encontrar resíduos de fácil e difícil biodegradação (OLIVEIRA, 2001).

A biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias que se baseia em processos microbiológicos para converter poluentes ambientais em produtos não tóxicos tais como dióxido de carbono, água e sais inorgânicos simples (BERNOTH et al, 2000). Algumas destas tecnologias de tratamento são aplicadas *in-situ*, isto é, no próprio local onde ocorreu a contaminação (impacto), onde os solos contaminados não são removidos ou as águas subterrâneas contaminadas não são bombeadas para o tratamento na superfície. Outras tecnologias requerem a remoção do material contaminado de sua origem para um local adequado, sendo tratado posteriormente. Estas tecnologias são denominadas *ex-situ* (TRINDADE, 2002). Algumas técnicas de biorremediação podem ser utilizadas em todas as tecnologias, visando à otimização do processo de degradação dos poluentes pelos microrganismos. Dentre estas se destacam: *bioestímulo* (que proporciona aumento da atividade microbiana nativa através da adição de nutrientes ou modificação das condições físico-químicas do ambiente); *bioaumento* (aumento da população microbiana através da adição de microrganismos exógenos, ou mesmo através da adição de microrganismos nativos do próprio solo impactado crescidos em laboratório e introduzidos no solo); adição de surfactantes, que auxilia a metabolização dos compostos poluentes ou ainda a adição de enzimas comerciais, que favorecem a oxidação de moléculas de difícil degradação em moléculas de fácil assimilação pelos microrganismos. Os hidrocarbonetos de petróleo, por serem poluentes hidrofóbicos tendem a ficarem sorvidos na matriz do solo,

diminuindo assim sua disponibilidade aos microrganismos e, conseqüentemente, limitando sua biodegradação.

1.1 JUSTIFICATIVA

O estado de Rondônia vem passando por grandes transformações na área industrial. As atividades relacionadas com a ciência, tecnologia e o meio ambiente, geralmente, não apresentam retornos imediatos e visíveis para a sociedade, mas quando não exercidas, acarretam grandes transtornos.

Tendo em vista a biodiversidade Amazônica, e seus recursos hídricos inestimáveis, é de extrema importância estudos envolvendo o monitoramento ambiental, entretanto, são necessárias também medidas de tratamento e recuperação de áreas poluídas.

Devido à instalação de grandes investimentos na região, como as Usinas do Madeira, a demanda por combustível na região tende a aumentar. Segundo dados da ANP (2008) as vendas de combustíveis vem aumentando nos últimos cinco anos. Por isto, o presente estudo investigou a potencialidade de microrganismos autóctones em biodegradar derivados de petróleo, visando o uso destes em processos tecnológicos de biodegradação. Deixando bem claro que a biodegradação pode vir a ser uma maneira de amenizar a contaminação de solos e corpos d'água, sendo então um ponto positivo para região.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 O PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS

O petróleo é uma complexa mistura de milhares de compostos orgânicos formados a partir de uma variedade imensa de matéria orgânica que foi transformada ao longo de milhões de anos, sob diferentes condições geológicas. O óleo cru contém primariamente carbono e hidrogênio, formando uma infinidade de hidrocarbonetos desde os mais leves até os mais pesados, mas também pode conter pequenas quantidades de enxofre, oxigênio, nitrogênio e alguns metais, como níquel, vanádio e ferro. A natureza variável destes fatores resulta em diferenças químicas bem distintas entre os óleos. Os produtos refinados são frações derivadas da destilação do óleo cru. Por causa destas diferenças na composição do óleo, os produtos refinados também diferem em suas composições químicas. Então, todo o óleo cru e derivados têm composições químicas que diferem de um para o outro, e esta variabilidade na composição química resulta num perfil único para cada óleo e providencia a base para a identificação de fontes de contaminação de óleo derramado (WANG et al, 1999).

Os estudos a respeito do impacto ambiental não é tarefa simples, pois estes compostos podem ser introduzidos no ambiente através de outras fontes, como por exemplos descargas industriais e urbanas, deposição atmosférica, processos diamagnéticos naturais (RIBEIRO, 2001). Existem mais de 60.000 compostos químicos em produção atualmente. Destes, cerca de 500 são de interesse ambiental, devido à toxidez, tendência a bioacumulação e persistência no meio ambiente (MACKAY et al, 1998).

Tabela 1. Composição do Petróleo. (Adaptado de BARKER & HERSON, 1994).

Produto (fração destilada)	Principais
Gás	Alcanos de cadeia normal ou ramificada, com um a cinco átomos de carbono. Ex. etano, propano, butano.
Gasolina	Hidrocarbonetos de cadeia normal ou ramificada, com 6 e 10 átomos de carbono. Ciclanos e alquibenzenos estão presentes

Querosene/ óleo Diesel n. 1	Hidrocarbonetos de cadeia normal ou ramificados, ciclo-alcanos, aromáticos e misturas de ciclanos com aromáticos. Baixos níveis de benzeno. Poucos poliaromáticos.
Óleo Diesel Leve	Hidrocarbonetos com 12 a 18 átomos de carbonos. N-alcanos maior que o do querosene. Ciclanos e olefinas aromáticas.
Óleo Diesel pesado	Hidrocarbonetos com 18 a 25 átomos de carbono.
Lubrificantes	Hidrocarbonetos com 26 a 28 átomos de carbono.
Asfálticos	Compostos policíclicos pesados

2.1.1 A gasolina e o óleo diesel

A gasolina é um combustível derivado de petróleo produzido na faixa de destilação que varia de 30 a 220° C, formada por uma mistura de diversos tipos de hidrocarbonetos: parafínicos, naftalênicos, aromáticos e mistos, com 4 a 10 átomos de carbono. No total a gasolina pode apresentar mais de 230 compostos (CUNHA, 1996; MORAIS & TAUKE-TORNISIELO, 2004).

No Brasil, é utilizada uma gasolina diferenciada, pois se trata de uma mistura de 75% de gasolina e 25% de álcool etílico (etanol). O teor de álcool na gasolina é especificado pela Agência Nacional de Petróleo – ANP, e é objetivo de lei federal.

A solubilidade efetiva de um composto orgânico presente na gasolina, pode ser estimada a partir da solubilidade do composto puro e sua fração molar na gasolina. A solubilidade na gasolina aumenta se o composto orgânico conter oxigênio, como o álcool e o éter. Quando a gasolina entra em contato com a água, o álcool existente neste combustível, completamente miscível em água, irá migrar para a água subterrânea (CORSEUIL & FERNANDEZ, 1999). Portanto, uma alta concentração de etanol na água pode facilitar a transferência dos BTXs presentes na gasolina para a fase aquosa, aumentando a solubilidade dos hidrocarbonetos aromáticos na água subterrânea, num processo chamado de “efeito de co-solvência” (BANERJEE & YALKOWSKY, 1988).

O óleo diesel contém de 2000 a 4000 hidrocarbonetos que compõem uma mistura de compostos de cadeias lineares e ramificadas, cicloalcanos e compostos aromáticos obtidos da destilação da fração média do petróleo (GALLEGO et al, 2001). Alguns desses compostos podem ser usados como indicadores na avaliação da intemperização do óleo diesel. Mudanças na razão das concentrações de hidrocarbonetos como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTXs) são devidas principalmente a processos de evaporação e dissolução. Estes compostos são caracterizados pela alta pressão de vapor e relativa solubilidade em água. Benzeno e tolueno dissolvem preferencialmente na água subterrânea quando comparados com o etilbenzeno e os xilenos, os quais têm menor solubilidade e são mais recalcitrantes à biodegradação (KAPLAN et al, 1997).

A figura 1 apresenta a classificação dos hidrocarbonetos segundo POTTER & SIMMONS, (1998).

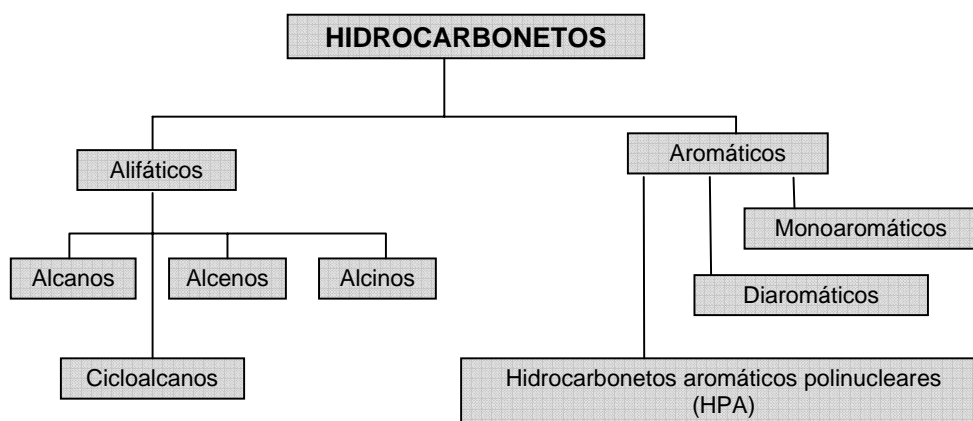


Figura 1. Classificação dos hidrocarbonetos (adaptado de Potter & Simmons, 1998).

A mobilidade da gasolina na água e no solo é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos presentes, dentre as quais as mais importantes são a solubilidade, a pressão de vapor, a densidade, a viscosidade dinâmica e o coeficiente de partição octanol-água (Miller, 2001; *apud* TROVÃO, 2006). O coeficiente de partição octanol-água é definido como a razão concentração de um composto orgânico dissolvido entre o octanol e a água, equilíbrio e descreve a tendência de partição de um composto entre a fase orgânica e a fase aquosa. Quanto maior esta razão, maior será a hidrofobicidade do composto. Na tabela 2 estão apresentadas algumas propriedades físico-químicas dos compostos BTXs.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos compostos BTXs.

Composto	Fórmula molecular	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Densidade (g.cm ⁻³)	Solubilidade em água a 25° C (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (atm)	Constante de Henry K _h (10 ³)(atm m ³ mol ⁻¹)	Coefficiente de partição octanol/água Log K _{cw} (25°C)
Benzeno	C ₆ H ₆	78,10	0,880	1780	0,1250	5,5	2,13
Tolueno	C ₇ H ₈	92,10	0,867	515	0,0370	6,6	2,69
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,867	152	0,0125	8,7	3,13
p-xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,860	198	0,00895	5,0	3,15
m-xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,864	187	0,00803	5,0	3,20
o-xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,880	175	0,00697	4,0	3,12

FONTE: Adaptado de KAIPPER (2003).

Como dito anteriormente, os derramamentos acidentais de combustíveis em postos de revenda está entre as mais frequentes das formas de contaminação ambiental por derivados de petróleo como diesel e gasolina.

A figura 2 apresenta os fenômenos que ocorrem durante um vazamento de tanques de armazenamento de combustíveis.

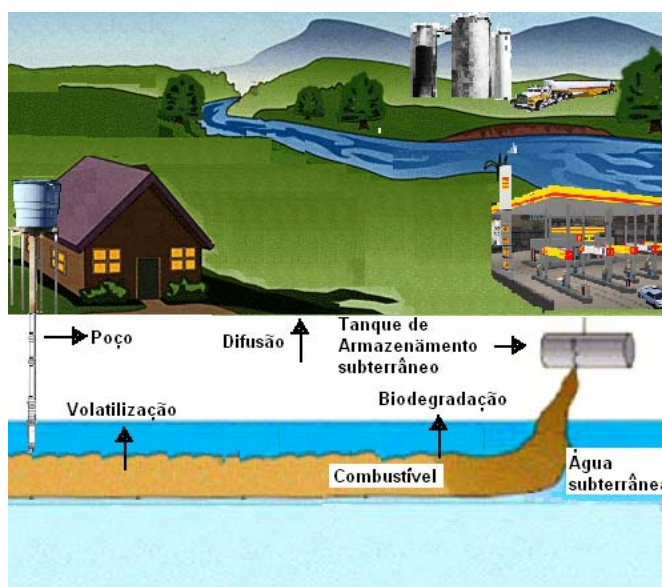


Figura 2. Vazamento de um tanque de armazenamento de combustível (Adaptado de KAIPPER, 2003).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) em 2005 existiam no Brasil 13 refinarias, 24 terminais marítimos, 27 terminais terrestres, 165 distribuidoras, 551 bases de distribuição, 35.585 postos de combustíveis cadastrados e uma produção de aproximadamente 1,75 milhão de barris de petróleo por dia (ANP, 2006). A relação quantidade dos postos de combustíveis cadastrados presentes nas regiões e estados brasileiros, segundo o anuário estatístico da ANP (2006) estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Relação da quantidade de postos de combustíveis por regiões brasileiras.

Regiões estados	Quantidade de postos	Regiões estados	Quantidade de postos
Norte	2047	Nordeste	6963
Acre	103	Alagoas	391
Amapá	85	Bahia	1744
Amazonas	391	Ceará	1040
Pará	724	Maranhão	635
Rondônia	373	Paraíba	613
Roraima	85	Pernambuco	1235
Tocantins	286	Piauí	579
Sul	7352	Rio Grande do Norte	512
Paraná	2671	Sergipe	214
Santa Catarina	1878	Sudeste	15999
Rio Grande do Sul	2803	Espírito Santo	633
Centro-Oeste	3224	Minas Gerais	4335
Distrito Federal	317	Rio de Janeiro	2185
Goiás	1385	São Paulo	8846
Mato Grosso	921		
Mato Grosso do Sul	601	Total de postos	35585

FONTE: (ANP, 2006).

Observa-se que a região Norte, segundo o anuário estatístico da ANP (2006), apresenta 2047 postos de combustíveis, na qual o Estado de Rondônia apresenta 373 postos perdendo apenas para os Estados do Pará e Amazonas.

Segundo dados da ANP (2008) as vendas de gasolina comum no Estado de Rondônia apresentou um salto de 136.073 m³ em 2000 para 192.111m³ em 2007, se formos comparar com os dados de até setembro de 2008 as vendas corresponde a 154.103 m³.

2.2 PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO AMBIENTAL - BIODEGRADAÇÃO

Nos tempos atuais, a técnica de biodegradação voltada para biorremediação tornou-se uma alternativa promissora para o tratamento de áreas ambientais contaminadas por derivados de petróleo e outras contaminações químicas. A biorremediação é um processo de tratamento com microrganismos que transformam substâncias tóxicas em substâncias menos tóxicas ou não-tóxicas. Poluentes tóxicos, sobretudo compostos orgânicos, podem ser degradados pelos microrganismos e ocorrer redução significativa das concentrações dos contaminantes, no solo e na água, eliminando-se riscos à saúde humana e ao meio ambiente (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

Acidentes por derramamento de derivados de petróleo decorrentes vazamentos em tanques subterrâneos de combustíveis é a causa mais comum de contaminação de águas subterrâneas (KAO et al, 2001). A biorremediação é uma técnica que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. O emprego de microrganismos no tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, é uma prática habitual em alguns países desenvolvidos. Os sistemas biológicos, geralmente, utilizados são microrganismos e plantas. No entanto, a biodegradação com microrganismos é a opção mais frequentemente empregada, tendo em vista que quando comparada com processos químicos e físicos, é uma alternativa ecologicamente mais segura e eficiente para reduzir a poluição por contaminantes orgânicos (MACEDO et al, 2002). Apesar dos resultados serem animadores as microbiotas e microrganismos de outras regiões podem não responder da mesma forma quando inseridos em um ambiente diferente do seu habitat.

As reações de degradação são reações de oxi-redução (redox), envolvendo a transferência de elétron (oxidação - perda de elétron) de compostos orgânicos (contaminante) para o aceptor de elétron (redução - ganho de elétron). Oxigênio é o aceptor para o metabolismo aeróbico, enquanto nitrato (NO_3^-), íon férrico (Fe^{3+}) e sulfato (SO_4^{2-}) servem como aceptores para as alternativas para o metabolismo anaeróbico. Esta transferência de elétron libera energia que é utilizada na alimentação e crescimento das células microbianas. A energia bioquímica associada com a biodegradação alternativa pode ser representada pelo potencial redox dos aceptores alternativos. O potencial redox mais positivo é o mais energeticamente favorável à reação de

degradação, porém deve-se levar em conta que organismos com metabolismo mais eficiente para crescer dominam sob os menos eficientes (BORDEN et al, 1995).

2.2.1 Degradação biótica

Quase todos os hidrocarbonetos do petróleo são biodegradados sob condições aeróbias. O oxigênio é um cosubstrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto e por fim é utilizado como aceptor final de elétrons para a geração de energia (YOUNG, 1984; BORDEN et al, 1995).

Em muitos casos, a maior limitação na biodegradação aeróbia em subsuperfície é a baixa solubilidade do oxigênio em água. Por exemplo, a mineralização aeróbia do tolueno ($C_6H_5-CH_3$) é representada pela seguinte equação:



A água saturada com ar contém de 6 a 12 ppm de oxigênio dissolvido. Por exemplo, a completa conversão do tolueno (e muitos outros hidrocarbonetos) para CO_2 e H_2O requer aproximadamente 3 g de O_2 por grama de hidrocarboneto. Usando-se essa taxa, o O_2 presente na água pode resultar na biodegradação de 2 a 4 ppm de hidrocarboneto através de processo estritamente aeróbio. Se a concentração de hidrocarboneto for maior que essa, a biodegradação deve ser incompleta ou deve acontecer mais vagorosamente por processo anaeróbio (BROWN et al, 1994). A extensão da biodegradação aeróbia é controlada pela quantidade de contaminantes, a taxa de transferência de oxigênio para a subsuperfície e o conteúdo original de oxigênio no aquífero (BORDEN, 1994). Os tempos de meia vida, por exemplo, do tolueno, podem variar entre 1 e 20 dias, dependendo da concentração microbiológica ativa (ALVAREZ et al, 1991; CHEN et al, 1992; CHIANG et al, 1989; WEBER e CORSEUIL, 1994), chegando a valores fora dessa faixa se também ocorrerem limitações de transferência de massa (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

A facilidade de biodegradação dependerá do tipo de hidrocarboneto. Os hidrocarbonetos de peso molecular baixo ou moderado (C_{10} a C_{24} , anel aromático simples) parecem ser facilmente degradáveis (ATLAS, 1988). Com aumento do peso molecular aumenta a resistência à biodegradação. Gasolina contém basicamente compostos com peso molecular baixo a moderado,

ao contrário do diesel que contém diversos compostos de alto peso molecular (BORDEN et al, 1995). A maioria dos compostos da gasolina é biodegradável em misturas de população microbiana, fato comprovado em testes realizados com amostras de aquíferos contaminados por gasolina (RIDGEWAY et al, 1990). Os autores observaram que muitos dos componentes individuais da gasolina não forneciam o suporte necessário para o crescimento microbiano como única fonte de carbono, mas quando uma mistura de substratos de gasolina dissolvida em água foi utilizada estes compostos foram degradados. Isto sugere que misturas de populações microbianas possam ser necessárias para degradação completa.

2.2.2 Acessibilidade dos poluentes aos microrganismos

Uma limitação comum do processo de degradação natural é a falta de contato adequado entre o poluente e os microrganismos. Os poluentes devem estar acessíveis nos seguintes aspectos: físico-químicos, estruturais e bioquímicos. Para os BTXs, em particular, estes pré-requisitos são satisfeitos, uma vez que podem ser dessorvidos de sólidos do aquífero para evidenciar a biodisponibilidade, não conter átomos grandes como o cloro e ser capazes de atravessar a membrana celular. No entanto, o efeito de co-solvência devido ao etanol afetará a biodisponibilidade dos BTXs na pluma de hidrocarbonetos retardando este contato (CORSEUIL et al, 1996).

2.2.3 Indução apropriada das enzimas biodegradativas

Este processo envolve a ativação específica da região do genoma das bactérias. Quando alguns poluentes estão presentes, estes iniciam a cascata de reações bioquímicas que resultam na transcrição de códigos genéticos necessários para a síntese de enzimas degradativas. Para que a reação de degradação dos derivados de petróleo tenha início, muitas enzimas requerem que a substância indutora, como por exemplo, o tolueno, deva estar presente em concentração maior do que o mínimo necessário para a indução (LINKIFIELD, 1989). De forma geral, esta concentração é baixa e a indução da enzima raramente é um fator limitante na biorremediação dos derivados (CHAPELLE, 1993).

A presença de substratos que são facilmente degradados pode exercer efeito inibidor (utilização preferencial de substrato) o qual retardaria a indução das enzimas em degradar BTXs. No Brasil, isto é um fator importante, pois a gasolina contém 25% de etanol, um substrato

facilmente degradado. Neste caso, um retardo no período pode ser observado durante o qual o etanol é degradado sem que haja nenhuma degradação significativa de BTXs (CORSEUIL et al, 1996).

A degradação de hidrocarbonetos é codificada pelo plasmídio OCT em *Pseudomonas putida* Gp01 que ocorre a partir da ligação com a monoxigenase do exterior da membrana, redutase rubredoxina serve para auxiliar a transferência de elétrons através do NADH para a hidroxilase que converte o alcano em álcool. O álcool pode ser oxidado para aldeído e ácido graxos antes de entra no ciclo de Krebs (ácido tricarboxílico). O modelo para o metabolismo de alcanos, incluindo a localização das proteínas Alk e os genes reguladores alk, é mostrado na figura 3. O operon alkBFGHJKL que codifica as enzimas necessárias para converter os alcanos em acetil-coenzima A (CoA), enquanto o alkST codifica a redutase rubredoxina (AlkT) e o regulador positivo para o operon alkBFGHJKL (Alks) (HAMME et al, 2003).

A figura 3 apresenta um esquema da degradação de alcanos por bactérias gran-negativas, mostrando a localização e função dos genes Alk e seus produtos. Os produtos incluem AlkB (alcano hidroxilase), AlkF e AlkG (rubredoxinas), AlkH (aldeído desidrogenase), AlkJ (álcool desidrogenase), AlkK (acil-CoA sintetase), AlkL (proteína da membrana exterior envolvida na captura do hidrocarboneto), AlkN (proteína metil-aceptora envolvida na quimiotaxi) AlkT (rubredoxina redutase), e AlkS (regulador positivo do operon *alkBFGHIJKL* e do genes *alkST*) (Adaptado de HAMME et al, 2003).

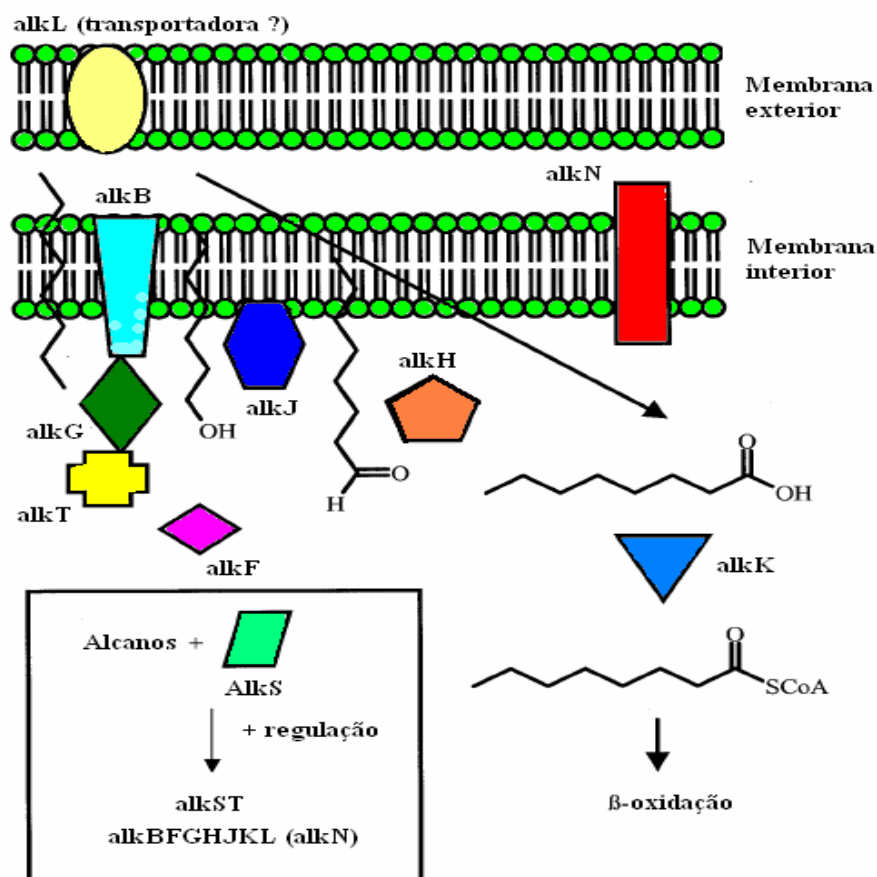


Figura 3. Esquema da degradação de alcanos por bactérias gram-negativas, mostrando a localização e função dos genes Alk e seus produtos (Adaptado de HAMME et al, 2003).

2.2.4 Disponibilidade de nutrientes inorgânicos

Microorganismos necessitam de macronutrientes para sintetizar componentes celulares como nitrogênio para aminoácidos e enzimas, fósforo para ATP e DNA, enxofre para algumas coenzimas, cálcio para estabilizar as paredes celulares e magnésio para estabilizar ribossomos. A razão C:N:P de 100:5:1 é geralmente suficiente para assegurar o crescimento irrestrito dos microorganismos em aquíferos (PAUL & CLARK, 1989). Mas também necessitam de micronutrientes para realizar certas funções metabólicas. Por exemplo, metais traço como Fe, Ni, Co, Mo e Zn são necessários para algumas atividades enzimáticas. Em geral, aquíferos minerais contêm nutrientes suficientes para assegurar a atividade microbiana. Contudo, análises

geoquímicas e avaliações de biodegradação em laboratório devem ser realizadas para verificar se a presença de nutrientes inorgânicos é suficiente para o sucesso da biorremediação natural.

2.2.5 Condições físico-químicas envolvidas no processo de biodegradação

- *pH adequado*

Enzimas são polímeros de aminoácidos, e a sua atividade requer o grau correto de protonação do aminoácido, o que é controlado pelo pH. O pH ótimo da água subterrânea é usualmente próximo do valor neutro, que é de 7,0, mas muitos microrganismos presentes nos aquíferos podem ser ativos no intervalo de pH entre 5,0 e 9,0. A água subterrânea é quase sempre tamponada dentro deste intervalo. No entanto, aquíferos contaminados por rejeitos municipais (esgoto, dejetos industriais, etc) podem conter elevada concentração de ácido orgânico e com isto o pH ser reduzido a 3,0 ou menos. Nestes casos, o pH pode representar um problema ambiental para as bactérias endógenas (CORSEUIL et al, 1996).

- *Temperatura adequada*

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes à atividade e à sobrevivência dos microrganismos. Temperaturas baixas reduzem a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, o que dificulta a penetração dos nutrientes e contaminantes. Temperaturas altas estão associadas à alta atividade enzimática e rápida razões de biodegradação (CORSEUIL & WEBER, 1994). Se a elevação da temperatura é muito além do valor ótimo, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos começam a se desnaturar e tornar-se inativos. A temperatura das águas subterrâneas no Brasil varia entre 20 e 25° C, sendo um intervalo muito favorável para a biorremediação natural.

- *Potencial redox*

Na biodegradação aeróbia, a presença de oxigênio é fundamental, uma vez que as etapas iniciais do catabolismo envolvem a oxidação dos substratos por oxigenases. O teor de oxigênio e o potencial redox relacionado determinam a presença de diferentes tipos de microrganismos, aeróbios ou anaeróbios. A decomposição anaeróbica de hidrocarbonetos ocorre muito lentamente (ROSATO, 1997).

2.2.6 Aspectos bioquímicos da biodegradação de hidrocarbonetos

De acordo com Briton (1984), algumas generalidades podem ser feitas acerca do processo de biodegradação de hidrocarbonetos, como as que seguem:

- Hidrocarbonetos alifáticos são geralmente mais facilmente biodegradados que os aromáticos;
- Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia normal são mais fáceis de serem biodegradados que os de cadeia ramificada. A introdução de uma ramificação em uma molécula de um hidrocarboneto diminuirá sua degradabilidade;
- Hidrocarbonetos saturados são mais susceptíveis à degradação que os insaturados. A presença de dupla ou tripla ligação C-C dificulta a biodegradação;
- Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa são mais facilmente degradados que os de cadeia curta. Hidrocarbonetos com menos de nove átomos de carbono são mais difíceis de serem degradados devido a sua toxicidade para os microrganismos. Muitos microrganismos especializados (ex: metanotróficos) podem degradar esses hidrocarbonetos e o comprimento de cadeia ótimo para a biodegradação parece ser de dez a vinte átomos de carbono (BRITON, 1984).

Os alcanos de cadeia normal são degradados primeiramente por oxidação do grupo metil terminal, seguido de uma clivagem da molécula na região entre o segundo e o terceiro átomo de carbono da cadeia (β -clivagem). Outras vias como a oxidação na região sub-terminal pela metanooxigenase encontrada em *Pseudomonas methanica*, também tem sido documentada (BRITON, 1984). A reação inicial na degradação do grupo metil envolve a adição direta do oxigênio ao carbono terminal do hidrocarboneto. Esta reação é mediada por uma classe de enzimas chamadas oxigenases. A adição de oxigênio ao carbono primário promove a formação de um álcool primário, que é oxidado a aldeído e finalmente transformado a ácido graxo. Um fragmento longo de dois carbonos terminais é clivado produzindo o acetil-CoA, que entra na via

metabólica do ciclo de Krebs. Uma repetição sequencial destas reações resulta na completa oxidação da molécula de hidrocarboneto. Já os álcoois subterminais são oxidados a cetonas, posteriormente a ésteres e esses, em seguida, são hidrolizados por esterases, gerando ácidos e álcoois que são metabolizados. Na figura 4, observa-se a sequência de reações proposta como via de degradação de alcanos (BEILEN et al, 2003).

A presença de ramificações na molécula de alcano dificulta a β -clivagem e torna a molécula de difícil biodegradação. O pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) por exemplo, é extremamente resistente à biodegradação devido às suas ramificações (RONTANI & GIUSTI, 1996).

A oxidação dos hidrocarbonetos alifáticos insaturados não ocorre da mesma forma que a dos alcanos. Muitos estudos de degradação de alcenos têm focalizado moléculas que contêm dupla ligação no carbono terminal. Esta posição permite vários mecanismos de ataque e diversas maneiras de degradação de alcenos têm sido observadas (SEEGER et al, 1997).

Hidrocarbonetos aromáticos como o benzeno, tolueno etilbenzeno e xilenos são encontrados, predominantemente, nas frações leves do petróleo, como a gasolina, muito embora possam também estar presentes em quantidades em forma de traços, em diversas frações pesadas. A degradação aeróbica de aromáticos por bactérias foi demonstrada pela primeira vez em meados de 1900 (ALEXANDER, 1994). Há um número elevado de vias metabólicas na degradação de aromáticos.

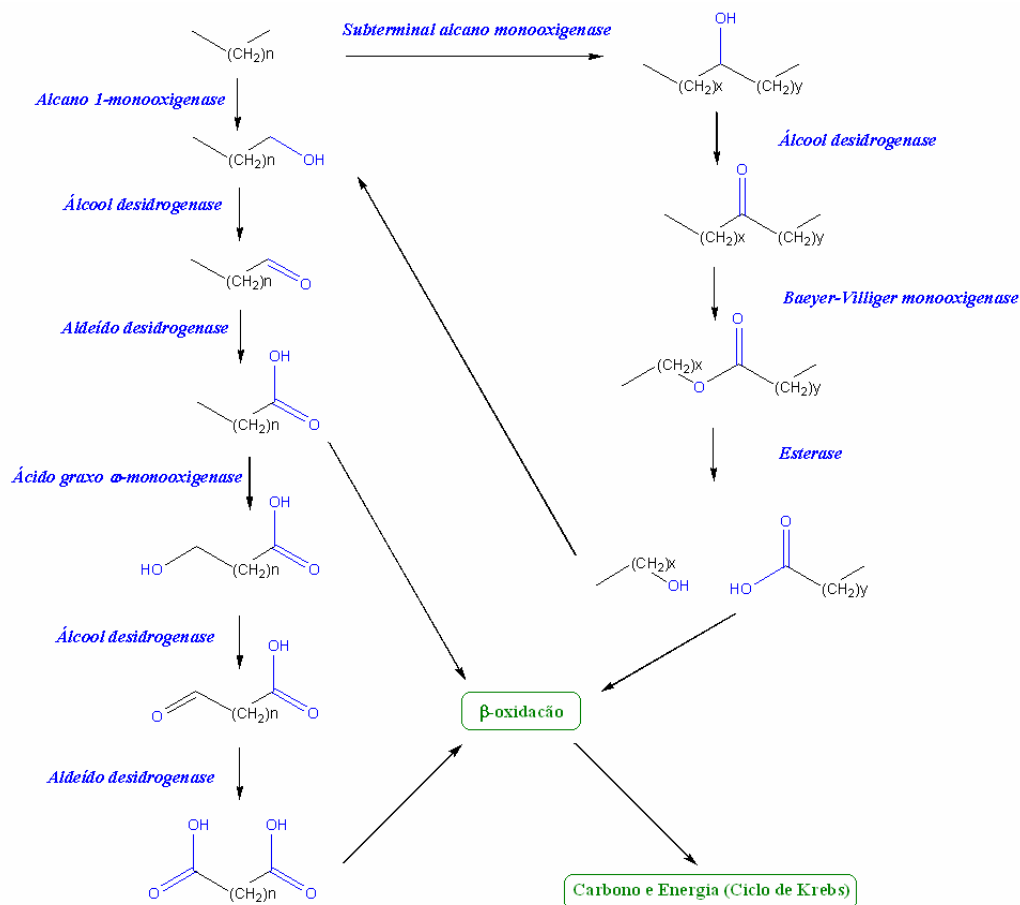


Figura 4. Vias metabólicas de degradação de n-alcanos (BEILEN et al, 2003).

O benzeno é degradado primeiro pela conversão em catecol ou em protocatecolato. O núcleo aromático nesses compostos é subsequentemente aberto por uma dessas duas vias: a ortoclivagem (via do 3-oxodipato) ou pela metaclivagem. A ortoclivagem envolve a clivagem de catecol ou protocatecolato entre os dois grupos hidroxil. Este processo leva a formação dos respectivos compostos: muconato e mucolactona, os quais são também metabolizados a 4-oxadipato, enol-lactona e depois ao 3-oxiadipato (beta-cetoadipato). O metabolismo procede à formação do acetil-CoA e succinato. Na metaclivagem, por outro lado, a clivagem inicial do anel, ocorre adjacente ao grupo hidroxil, formando o semi-aldeído 2-hidroxil-mucônico, como produto inicial da clivagem do anel. Subsequentemente a orto e metaclivagem do anel aromático procede a formação de piruvato, formiato, e acetaldeído, que vão alimentar o ciclo de Krebs. Na figura 5, mostra a sequência de reações para a formação do catecol e protocatecolato, proveniente da

degradação de e de HPA's (antraceno, fenantreno e naftaleno), e na figura 6 estão apresentados os esquemas das reações de orto e metaclivagem do anel aromático (SEEGER et al,1997; BARKER & HERSON, 1994).

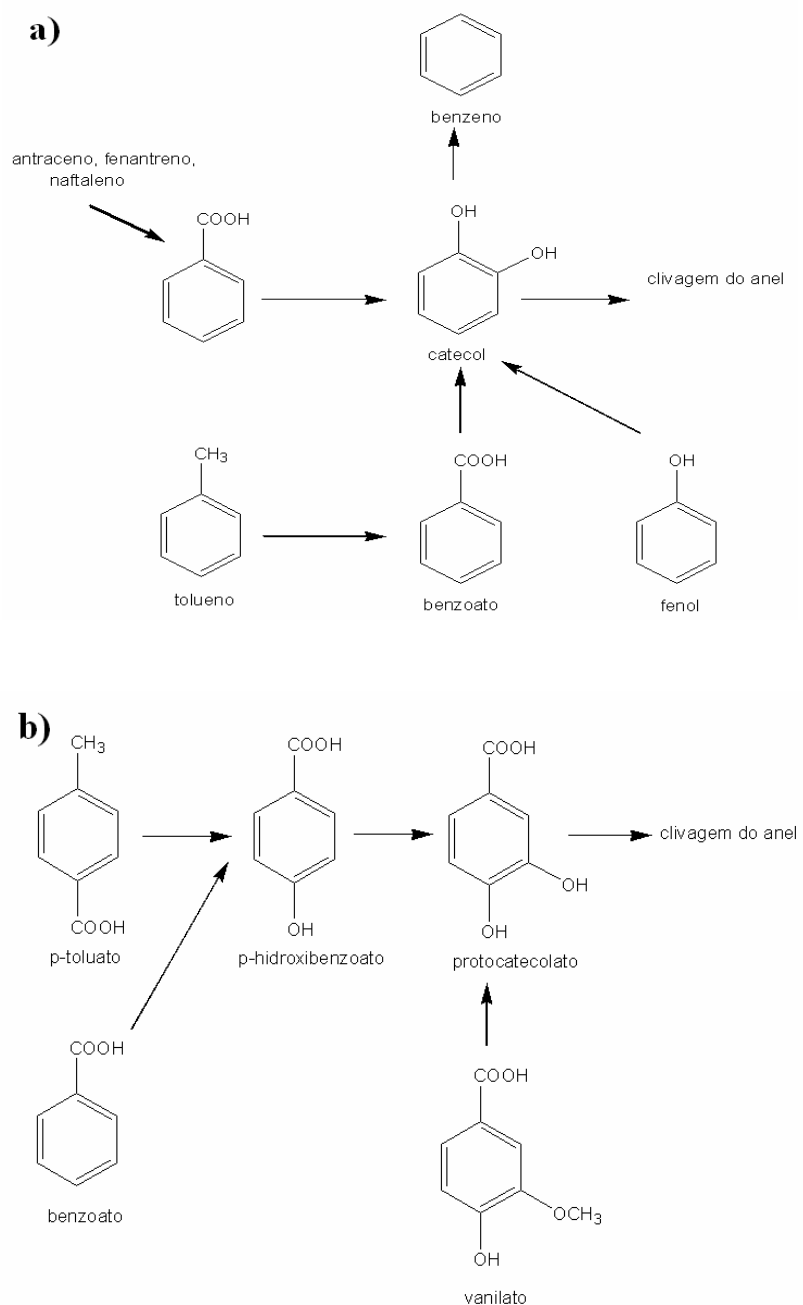


Figura 5. Degradação inicial do benzeno: (a) Formação do catecol e (b) Formação do protocatecolato (SEEGER et al,1997).

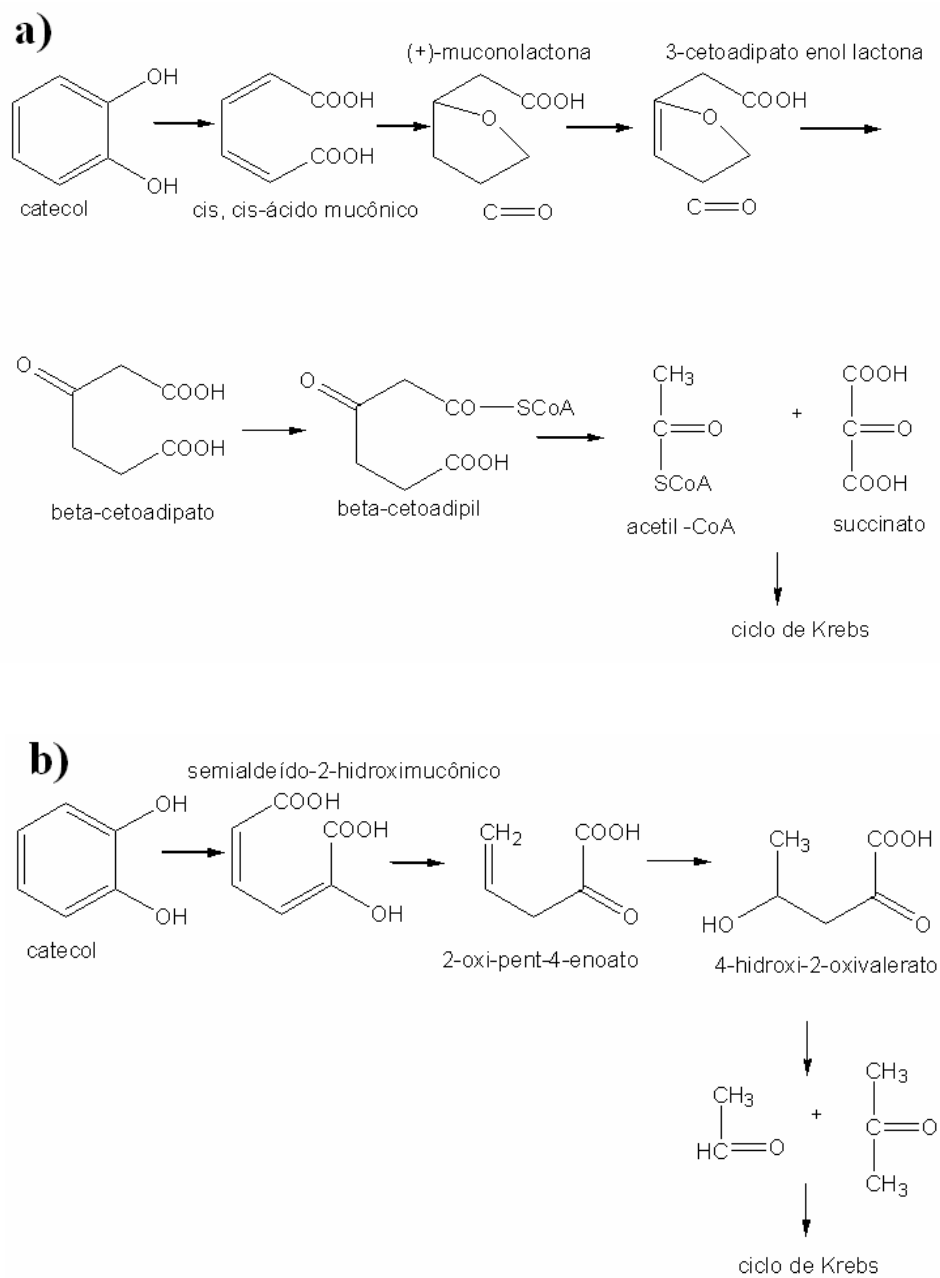


Figura 6. Clivagem do anel aromático: (a) Ortoclivagem e (b) metaclivagem (BARKER & HERSON, 1994).

2.3 TOXICOLOGIA DOS COMPOSTOS BTXs

Como dito anteriormente dentre os hidrocarbonetos derivados de petróleo os compostos benzeno, tolueno e os isômeros do xileno, incluindo o etilbenzeno, são os mais tóxicos, mais solúveis e de mais difícil degradação, devido também, a sua alta estabilidade de seus anéis com duplas ligações conjugadas (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; BARKER & HERSON, 1994).

Estudos com animais e com o homem demonstraram a rápida absorção dos compostos BTXs pela via pulmonar, com índices de retenção para o homem entre 30 a 80%. Os BTXs sofrem modificações dentro do organismo, ou seja, o organismo apresenta um conjunto de reações catalisadas por enzimas, conhecido como biotransformação, responsável pela conversão das substâncias lipossolúveis em hidrossolúveis, facilitando, assim, sua eliminação. A biotransformação destes compostos pode resultar tanto em produtos menos tóxicos que o precursor, como em produtos responsáveis pela ação tóxica como os intermediários da biotransformação do benzeno (PEDROZO et al, 2002).

O benzeno é tóxico quando introduzido no organismo por qualquer via, porém, a intoxicação comumente ocorre por inalação dos vapores, seguida pelas vias: oral e dérmica. Estudos ao longo dos anos evidenciaram que o benzeno é um composto carcinogênico tanto para humanos como para animais. Os mecanismos de ação tóxica do benzeno ainda não estão totalmente esclarecidos, embora haja fortes evidências que relacionem seus efeitos à sua biotransformação, com a formação dos seus principais metabólitos: fenol, catecol, muconaldeído e hidroquinona. Muitas pesquisas laboratoriais com animais e estudos epidemiológicos em humanos mostraram a relação causal entre a exposição ao benzeno e a ocorrência de doenças como a leucemia linfóide, leucemia mielomonocítica, neoplasmas hematológicos, desordens sanguíneas, como a pré-leucemia e anemia apática. Além destas doenças, experimentos com animais comprovaram o aumento do risco de tumores em múltiplas espécies, em múltiplos órgãos (fígado, estômago, pulmões, ovários, e glândulas mamárias), desordens mentais, psiconeuróticas e de personalidade. É provável que estas respostas ocorram devido a interações dos produtos metabólicos do benzeno com o DNA. Observa-se também, ligeiros transtornos digestivos e, no caso das mulheres, existem transtornos da menstruação. Uma exposição aguda por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte de uma pessoa. (PEDROZO et al, 2002; MENDES, 1993; TIBURTIUS et al, 2004; MELLO et al, 2006;).

O tolueno é um contaminante ambiental comum, encontrado em muitos locais de despejo de resíduos. Este é um depressor do sistema nervoso central e, mesmo em baixas concentrações, produz fadiga, fraqueza e confusão mental. A exposição pode irritar os olhos, nariz e garganta. A ingestão pode causar irritação da boca e faringe, vômitos, dores abdominais e diarreia. Secundariamente aos vômitos podem ocorrer manifestações de tosse, sufocação, broncoespasmo e cianose. Na inalação de seus vapores observa-se: estado de euforia, instabilidade emocional, incoordenação muscular, cefaléia, vertigens, náuseas e vômitos. Após esta fase inicial o intoxicado apresenta uma irritabilidade acentuada, cefaléia, náuseas e astenia. A exposição prolongada pode causar ressecamento e rachadura da pele, perda de apetite, náusea e danos aos rins e fígado, podendo causar danos ao cérebro (PEDROZO et al, 2002; TIBURTIUS et al, 2004).

A exposição ao xileno resulta no aparecimento de cefaléia, transtornos da visão, diminuição da coordenação, irritação no nariz e garganta; também pode causar dores de cabeça, náuseas e vômitos, além do cansaço e danos ao estômago. Os riscos à saúde por efeitos agudos podem ocorrer imediatamente ou pouco tempo após a exposição a xilenos. Nas exposições crônicas os sinais e sintomas mais importantes compreendem anemia moderada, cefaléia, anorexia, estado de fadiga, náuseas e hemorragia na mucosa nasal. Altos níveis podem causar tonteados, delírios, desmaios e até a morte (PEDROZO et al, 2002; TIBURTIUS et al, 2004).

Os riscos à saúde, devido à exposição aguda a etilbenzeno, são tonteados, delírios, dores de cabeça e vômito, convulsões, coma e/ou morte. Também pode irritar os olhos, nariz e garganta. Os efeitos podem ocorrer algum tempo após a exposição ao etilbenzeno e podem permanecer por meses ou anos. A exposição repetida pode causar riscos à vida (PEDROZO et al, 2002).

Com o objetivo de controlar a emissão de efluentes altamente contaminados nos corpos de água, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece critérios de lançamento de efluentes de qualquer fonte poluidora em corpos d'água receptores. Estes padrões de lançamento são definidos pela RESOLUÇÃO N° 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005). Na tabela 4 são apresentados os padrões de lançamento dos compostos BTXs presentes em efluentes líquidos desta Resolução.

Tabela 4. Padrões de lançamento para os compostos BTXs (CONAMA, 2005).

Composto	Valor Máximo em águas	Valor Máximo em águas
	doces	Salobras
Benzeno	0,005 mg/L	0,700 mg/L
Tolueno	0,002 mg/L	0,215 mg/L
Etilbenzeno	0,090 mg/L	0,025 mg/L
Xilenos	0,300 mg/L	-

2.4 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS

Os microrganismos são os principais agentes responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza. Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticos) (KATAOKA, 2001).

Os primeiros estudos da utilização de hidrocarbonetos por microrganismos foram realizados por Sohnger e Kaserer em 1906 (BUSHNELL & HAAS, 1941). Em 1913, Sohnger relatou que gasolina, querosene, parafina e óleo de parafina poderiam ser oxidados a CO₂, água e traços de ácidos orgânicos por microrganismos. Os microrganismos estudados pertenciam principalmente aos gêneros *Mycobacterium* e *Pseudomonas*.

A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de microrganismos, pois, vários grupos de bactérias, fungos e actinomicetos têm mostrado possuir essa capacidade (KATAOKA, 2001).

Gutnick & Rosenberg (1977) postularam 3 características essenciais para a utilização de hidrocarbonetos pelos microrganismos:

- Um sistema eficiente de absorção de hidrocarbonetos com sítios especiais de ligação e/ou produção de substâncias emulsificantes para o transporte do hidrocarboneto ao interior da célula;
- Enzimas oxigenases específicas;

- Especificidade induzida – resposta positiva do organismo ao hidrocarboneto.

Deste modo, os vários meios que os microrganismos têm desenvolvido a fim de solucionar estes três problemas provavelmente contribuem para o fato de mais de 200 espécies diferentes terem sido descritas com capacidade de utilização de hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001).

Leahy & Colwell (1990) citam os seguintes gêneros de bactérias como os mais importantes: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas*. Kadri et al (1986), Shamshoom et al (1990), Sorkhoh et al (1990), Al-hadhrami et al (1995), estudando a distribuição de bactérias que degradam hidrocarbonetos, identificaram: *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Flavobacterium* sp., *Klebsiella cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella phenylpiruvica*, *Nocardia* sp., *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis*, *Vibrio* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio fischeri* e *Xanthomonas maltophilia*.

Venkateswaram & Harayama (1995), através do enriquecimento de culturas, isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto, verificando que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presentes foram biodegradadas por uma cultura mista. Contudo, quando as culturas foram colocadas puras, nenhuma delas apresentou melhor degradação do que quando estavam consorciadas. As espécies isoladas foram *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas diminuta*, *Moraxella* sp., *Sphingobacterium* sp. e *Ochrobactrum* sp..

Em uma cultura mista, o produto metabólico pode ser degradado por uma outra espécie e o ataque de outros microrganismos pode levar a uma completa degradação do produto, mesmo que dentro da comunidade não exista um microrganismo capaz de degradá-lo totalmente (KATAOKA, 2001).

Deste modo, estudos realizados com cultura mista possuem vantagens sobre estudos realizados com cultura pura. A primeira e mais importante é que a capacidade biodegradativa de uma comunidade é muito maior quantitativa e qualitativamente. Segundo, a resistência da comunidade a substâncias tóxicas pode ser muito maior porque há uma maior probabilidade de que um organismo que possa detoxificá-las esteja presente, e finalmente, o fato de que a

mineralização de compostos xenobióticos algumas vezes requer a união da atividade de múltiplas enzimas (GRADY, 1985).

Estudos realizados por Morais & Tauk-tornisielo (2004) com a bactéria *Acinetobacter Baumannii* avaliaram seu potencial em biodegradar derivados de petróleo, através do seu desempenho metabólico na presença de gasolina. O gênero *Acinetobacter* está amplamente citado na literatura como potencial assimilador de hidrocarbonetos derivados de petróleo (LEHY & COLWELL, 1990; CHAINEAU et al, 1999; GALLEG0 et al, 2001).

2.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO EM LABORATÓRIO

Para demonstrar que uma tecnologia de biorremediação é potencialmente útil, é importante verificar a biodegradação dos poluentes sob condições controladas. Isto geralmente não é possível de se obter *in situ*, assim, esta verificação deve ser obtida através de experimentos laboratoriais, os quais demonstram o potencial que um determinado tratamento pode ter em estimular a remoção de xenobióticos de um local contaminado (BAILEY et al,1973). Experimentos laboratoriais que mais se aproximam das condições reais do ambiente são provavelmente os mais capazes de produzirem resultados relevantes (BERTRAND et al,1983). Em muitos casos, isto envolve o uso de amostras coletadas no campo que contenham populações microbianas autóctones. Em tais experimentos é importante incluir controles que possam diferenciar fatores abióticos como a evaporação e a fotodegradação das taxas de biodegradação. Os experimentos não excluem a necessidade de demonstrações em campo, contudo são críticos para se estabelecer a credibilidade científica de uma determinada estratégia de biorremediação (MARIANO, 2006).

2.6 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO: MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, SPME

A etapa de preparação em um processo analítico tipicamente consiste de um procedimento de extração que resulta no isolamento e enriquecimento dos componentes de interesse da matriz amostra. Uma extração, portanto, pode ser desenvolvida com diferentes graus de seletividade, velocidade e conveniência e isto depende também de todas as aproximações e condições usadas na organização do processo de extração. Durante as ultimas décadas pesquisas tem sido desenvolvidas com o objetivo de introdução de novas tecnologias que levaram a redução do uso de solventes, automatização e miniaturização.

A figura 7 mostra as principais técnicas de extração e seus fundamentais princípios de cada aproximação.



Figura 7. Classificação das técnicas de extração.

Em princípio, exaustivas extrações não requerem calibrações, porque é assumido que a maior parte dos analitos foi transferida para a fase de extração. Entretanto, na prática para uma confirmação satisfatória do recobrimento são adicionados padrões internos (*surrogates*). Para evitar exaustivas extrações (técnica líquido-líquido) são substituídos por sorvente empacotados em materiais suportes como seringas (técnica de SPE – *Solid Phase Extraction*). Neste caso, um largo volume de amostras pode passar pela seringa (ou cartucho), sendo os analitos retidos no

sorvente. Em dinâmicas extrações com solvente, por exemplo, em aparelho de *Soxhlet*, o solvente continuamente remove o analito da matriz sólida (PAWLISZYN, 2003).



Figura 8. Determinador de gordura *soxhlet* modelo Te-004. Equipamento utilizado na extração, por solventes de lipídeos.

A técnica de Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase MicroExtraction*), introduzida por Arthur e Pawliszyn no início da década de 90 (CRYSTAL & PAWLISZYN, 1990), é um método de extração que dispensa o uso de solventes e combina a extração, concentração e introdução da amostra no cromatógrafo em duas etapas. Uma fibra de sílica fundida recoberta com uma fase sorvente, como polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA), é usada para extrair analitos da água, solo e amostras gasosas. Os analitos extraídos são dessorvidos termicamente em injetor de cromatógrafo a gás (AUGUSTO & VALENTE, 2000).

A técnica de SPME, segundo estudos iniciais foi desenvolvida com o objetivo de facilitar o preparo rápido das amostras (SILVA, 2005). No primeiro trabalho, publicado em 1990, a técnica foi aplicada a diversas amostras aquosas (CRYSTAL et al, 1992). Posteriormente, foi proposta e avaliada sua aplicação na extração e pré-concentração de analito em *headspace* (ZHANG & PAWLISZYN, 1993). Neste formato esta técnica revelou-se, com melhor repetibilidade e reprodutibilidade que os métodos convencionais da época, (MACGILLIVRAY, 1994).

O princípio da técnica é a distribuição do analito entre a amostra e um microcomponente extrator, o qual consiste de material sorvente (polímeros ou sólidos adsorventes) que recobre uma fibra de sílica fundida. No dispositivo básico de SPME (comercializado pela Supelco Inc., Bellefont, PA – EUA desde 1993) 10 mm de uma das extremidades de uma fibra de sílica fundida (com 100 mm de comprimento e diâmetro de 110 160 μm) são recobertos pelo material sorvente (com espessuras que variam de 7 a 100 μm e seus volumes de 0,03 a 7 μL (CARASEK, 2002).

Devido à fragilidade, as fibras de SPME são fornecidas montadas no interior de uma agulha hipodérmica para maior proteção (Figura 9), e esta acoplada no interior de um aplicador (Figura 10).

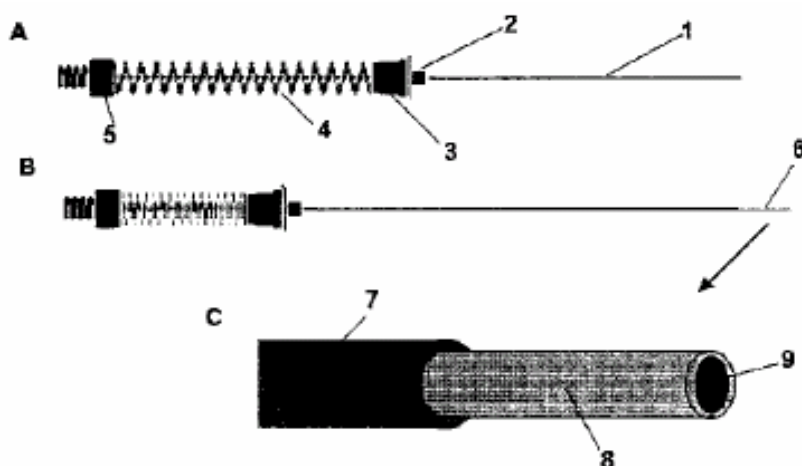


Figura 9. Conjunto comercial de fibra de SPME. (A) fibra retraída no interior da agulha (tubo hipodérmico de diâmetro externo de 0,56mm); (B) fibra exposta e, (C) detalhe ampliado da fibra de SPME. (1) agulha de aço inoxidável; (2) base de latão; (3) septo de silicone; (4) mola; (5) porca; (6) fibra de sílica recoberta; (7) sorvente (recobrimento); (8) núcleo de sílica fundida e (9) fibra ótica (AUGUSTO & VALENTE, 2002).

Na figura 10 pode ser visto com mais detalhes o formato de uma fibra de SPME.

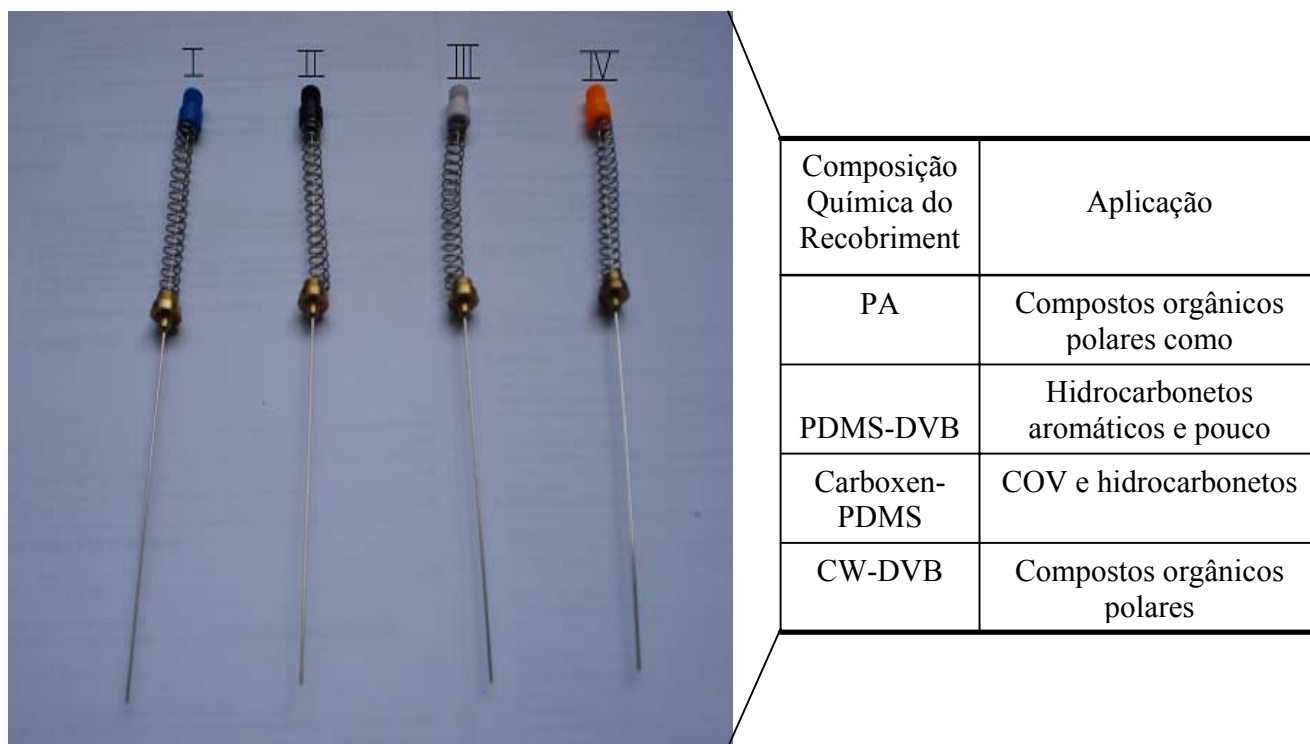


Figura 10. Fibras de SPME. Legenda I- Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB); II- Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS); III- Poliacrilato (PA) e IV- Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB).

A fibra de SPME é colada em um microtubo de aço e inserida em uma agulha hipodérmica para maior proteção (2). Quando o êmbolo (7) é pressionado, tensiona-se a mola (5) expondo assim a fibra (1) ao ambiente. Após utilização da fibra de SPME, o sorvente é protegido de danos mecânicos e do ambiente pela retração da fibra para o interior da agulha hipodérmica. O aplicador é reutilizável, pois permite a troca do conjunto (fibra + agulha) quando necessário (LOPES et al, 2002). O esquema de um aplicador comercial está ilustrado na figura 11.

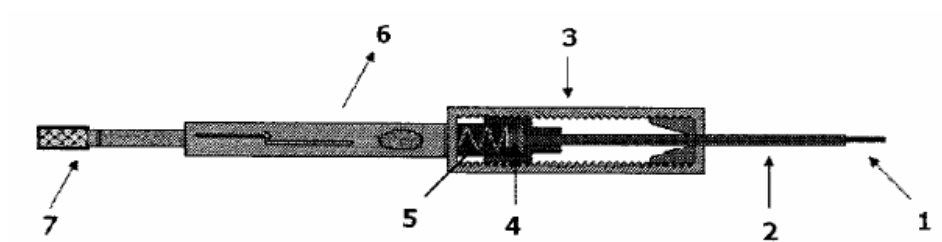


Figura 11. Esquema de um aplicador comercial utilizado em SPME. (1) fibra de SPME; (2) agulha de aço inoxidável; (3) corpo de aplicador; (4) septo de silicone; (5) mola; (6) aplicador; (7) êmbolo (AUGUSTO & VALENTE, 2002).

A figura 12 apresenta um aplicador comercial de SPME.



Figura 12. Aplicador comercial utilizado em SPME.

O quadro 1 apresenta especificações das principais fibras de SPME e suas aplicações.

Quadro 1. Especificações das principais fibras de SPME disponíveis comercialmente (SUPELCO, 1999).

Tipo	Material de Recobrimento	$L_f / \mu\text{m}$	$\Delta T / ^\circ\text{C}^*$	Aplicações
Não-polares	PDMS	100	200-270	Apolar, volátil
		30	200-270	Apolar, volátil e Semi-volátil
		7	220-320	Apolar, semi-volátil e não volátil
Polares	PA	85	220-310	Média e alta polaridade
	CW-DVB	65	200-260	
Bipolares	PDMS-DVB	65	200-270	Voláteis e não voláteis
	Carboxen-PDMS	75	200-260	Voláteis

* $\Delta T / ^\circ\text{C}$ é a faixa de temperatura de operação recomendada, L_f é a espessura de recobrimento.

2.6.1 Operação básica em SPME

A operação em SPME tem duas etapas. Na primeira, perfura-se o septo da tampa do frasco da amostra e pressiona-se o êmbolo, expondo a fibra. Os analitos são sorvidos na fibra após certo tempo de equilíbrio. Retrai-se a fibra, retirando a mesma do frasco da amostra. Na segunda etapa, perfura-se o septo do injetor de um CG com a ponta da agulha hipodérmica contendo os analitos sorvidos, pressiona-se o êmbolo expondo a fibra ao interior do injetor do CG. O filme fino do sorvente se aquece e os analitos são dessorvidos termicamente e arrastados para a coluna cromatográfica para separação. A fibra é retraída e retirada do injetor, sendo possível sua reutilização (SILVA, 2005).

A sequência de uso de um sistema de SPME está ilustrada na figura 13.

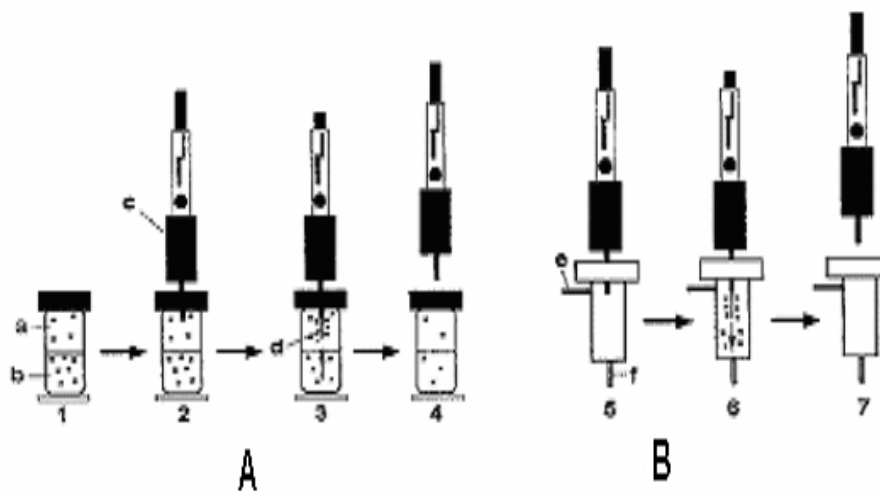


Figura 13. Procedimento básico para Microextração em Fase Sólida: (a) headspace; (b) amostra; (c) aplicador; (d) fibra extratora; (e) entrada de gás de arraste e (f) coluna cromatográfica. (A) extração; e (B) dessorção. (1) saturação do headspace; (2) perfuração do septo do frasco de amostra; (3) exposição da fibra de SPME e extração dos analitos; (4) retração da fibra para o interior da agulha hipodérmica; (5) perfuração do septo do injetor do CG; (6) exposição da fibra e dessorção dos analitos; e (7) retração da fibra para o interior da agulha (AUGUSTO & VALENTE, 2002).

A técnica de SPME possui algumas limitações. Entre elas é a faixa de temperaturas onde as fibras comerciais de SPME podem ser utilizadas na dessorção dos analitos. Uma outra limitação é a restrição da exposição das fibras a solventes orgânicos, o que é especialmente sério quando esta é aplicada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, no inglês HPLC). Estas restrições são comuns em muitas fibras comerciais de SPME, pois elas são preparadas apenas pela deposição física ou reticulação parcial dos recobrimentos na superfície de sílica fundida (ZHANG & PAWLISZYN, 1993).

2.6.2 Seleção dos Modos de Extração

Essencialmente, existem dois modos de extração a serem considerados em SPME: extração direta e extração através do *headspace*. Na primeira, a fibra é inserida diretamente na matriz (geralmente aquosa), e na segunda, a fibra é exposta à fase de vapor em contato com a amostra e os analitos presentes na amostra passam para a fase de vapor e então são sorvidos na fase estacionária (Supelco Inc. *Solid Phase Microextraction*). Para aumentar a velocidade de extração, em ambos os modos, é necessário uma agitação vigorosa para transporte rápido dos analitos.

A extração direta é mais aconselhável para analitos que possuem volatilidade de média para baixa, enquanto que a extração através do *headspace* é aconselhável para analitos que possuam volatilidade de média a alta (PAWLISZYN, 2002). Na extração através do *headspace*, os analitos mais voláteis são, via de regra, extraídos mais rapidamente do que os semi-voláteis, pois a concentração dos analitos mais voláteis na fase de vapor é maior do que na solução, já que possuem constantes de Henry mais baixas. Então, quando se necessita extrair compostos voláteis utiliza-se extração via *headspace*, evitando, assim, que se extraiam analitos indesejados como os não-voláteis que permanecem presentes na matriz aquosa. A extração através do *headspace* protege o recobrimento da fibra de danos causados por analitos com altos pesos moleculares e outros interferentes não-voláteis presentes na matriz, como proteínas. O modo de extração via *headspace* facilita modificações da matriz, como por exemplo, adição de ácidos ou bases, sem danificar a fibra.

A figura 14 ilustra os modos de extração utilizados em SPME.

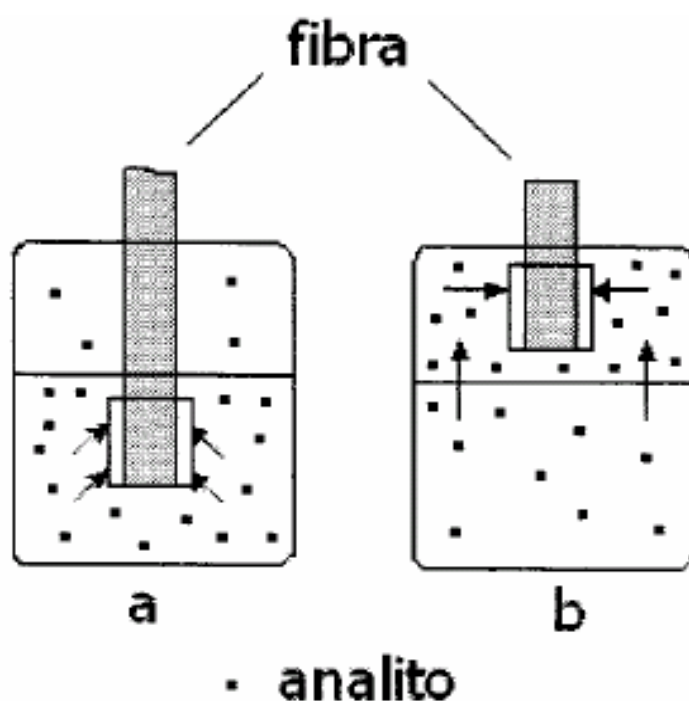


Figura 14. Modos de extração utilizados em SPME: a. extração direta e b. extração do *headspace* (PAWLISZYN, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- ✓ Avaliar o potencial de consórcios microbianos da biodiversidade amazônica com capacidade para degradação de poluentes orgânicos derivados de petróleo.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar consórcios ou microrganismos capazes de degradar derivados de petróleo a H_2O e CO_2 , ou a produtos com menor toxicidade;
- ✓ Realizar ensaios de biodegradação em sistemas contaminados com diesel e gasolina;
- ✓ Avaliar a ocorrência de subprodutos formados durante o processo de biodegradação;
- ✓ Isolar e identificar microrganismos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Cromatógrafo

Os ensaios de biodegradação foram realizados no cromatógrafo CG17A (Shimadzu), equipado com FID (detector de ionização de chama), injetor tipo *split-splitless* com liner para SPME de $d_i = 0,75$ mm e outro liner para *headspace*. $d_i = 1.20$ mm. Coluna cromatográfica capilar de fenilmetilsiloxano DB-5 (J & W) $L = 30$ m, $d_i = 0,25$ mm, $d_f = 0,25$ μ m, tendo hélio como gás de arraste (fluxo de 1,0 mL/min). Para gasolina utilizou injetor a 230° C no modo *splitless*, detector a 250° C e temperaturas programadas: 35° C por 1 min seguido de uma rampa de 5° C/min até 200°C, depois 30° C / min até 290° C. Para diesel utilizou injetor a 230 °C no modo *splitless*, detector a 250° C e temperaturas programadas: 50° C seguido de uma rampa de 6° C/min até 200° C e depois 30° C/min até 290° C. Para a caracterização dos compostos os testes foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas utilizando um equipamento Thermoelectron modelo TRACE GC ULTRA - DSQ. Foi utilizada coluna capilar OV5-MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m), tendo como gás carreador o hélio (1,0 mL/min). O modo de operação do espectrômetro de massas foi por impacto de elétrons a 70 eV. O escanamento das massas foi feito no modo *Full Scan* 43 - 650 para diesel e gasolina. Os diversos constituintes químicos presentes na fração da gasolina e diesel foram identificados através da comparação dos espectros de massas com o espectro do banco de dados da biblioteca de espectros “NIST” (National Institute of Standards and Technology). A análise dos espectros de massas e do índice de retenção (IR) foi calculado a partir do tempo de retenção dos hidrocarbonetos lineares presentes nas amostras.

$$IR = [100 \times \Delta N(TR_S - TR_{HA}) / (TR_{HD} - TR_{HA})] + 100 \times N, \text{ Onde:}$$

IR= Índice de Retenção.

ΔN = É a diferença de número de carbonos entre os hidrocarbonetos com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção da substância em análise e o hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior a mesma substância em análise.

TR_S = Tempo de retenção da substância em análise.

TR_{HA} = Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção da substância em análise.

TR_{HD} = Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção da substância em análise.

N = É o número de carbonos contido no hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção da substância em análise.

4.1.2 Microextração em Fase Sólida

Fibras recobertas com 65 μ m de Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) conectadas a um aplicador 5-7330 (Supelco Bellefont – PA, EUA). As fibras foram acondicionadas antes do uso segundo as instruções do fabricante e, entre extrações, as fibras foram mantidas por 3 min no injetor aquecido do CG para eliminar possíveis resíduos que poderiam interferir nos resultados.

4.1.3 Solventes, reagentes e vidrarias

Frascos de vidro de 10 e 50 mL com fundo reto; septos de teflon e lacres de alumínio (Samavidros); balões volumétricos de 25 e 100 mL com tampa de teflon (Vidrolabor); pipetas volumétricas e graduadas de 2, 5 e 10 mL (Pyrex e Satelit); termômetros graduados de -10°C a 150°C; agitador magnético tipo RH B-KT/C (IKA); incubadora (SHAKER) MA-420 Marconi e micropipetas de volumes fixos de 5-1000 μ L.

4.1.4 Combustíveis

As amostras de gasolina e diesel utilizadas em todos os ensaios foram adquiridas em um posto de combustíveis com bandeira da *Shell*, situado no centro da cidade de Porto Velho – RO.

4.2 MÉTODOS PARA O MONITORAMENTO DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO

4.2.1 Extração de compostos voláteis

4.2.1.1 Compostos voláteis apolares

Para observar a degradação de diesel e gasolina foi escolhida a fibra de microextração em fase solida Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno 65 μ m - azul (PDMS/DVB) da Supelco (Kit 57320-U), indicada pelo fabricante para compostos voláteis com massa molar variando entre 50 a 300 g.mol⁻¹, sendo o polidimetilsiloxano indicado para compostos apolares (SUPELCO, 1999). A fibra foi condicionada previamente no injetor do cromatógrafo por pelo menos 3 minutos a 220°C antes de ser utilizada para extração dos compostos voláteis. Desta forma evitou-se a contaminação das análises por analitos advindos de extrações anteriores. Para a avaliação foi adicionado em frasco de 50 mL um volume de 20 mL de água deionizada e autoclavada e 20 μ L de diesel para que desta forma fosse possível avaliar o perfil dos hidrocarbonetos presentes no diesel utilizada. O processo de extração otimizado foi obtido utilizando 40° C e 5 min de equilíbrio para a formação do *headspace*, seguido de 5 min de exposição da fibra de SPME para o equilíbrio trifásico entre sistema, *headspace* e fibra de SPME. Os mesmos procedimentos foram adotados para os testes com gasolina, devido o fato de estas condições terem apresentado os melhores resultados para diesel.

4.2.1.2 Compostos voláteis polares

Para observar a possível formação de compostos polares formados através de processos oxidativos presentes no metabolismo de microrganismos aerobicos a partir da degradação de diesel e gasolina escolhida a fibra de microextração em fase sólida PA (Poliacrilato - branca), da Supelco (Kit 57320-U), indicada pelo fabricante para compostos de media a alta polaridade. A fibra foi condicionada com descrito anteriormente.

4.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS E SEMIVOLÁTEIS

4.3.1 Extração líquido-líquido

Foram adicionados 20 mL de meio de cultura em um funil de separação de 50 mL. A fase aquosa foi extraída 3 vezes com 10 mL de acetato de etila. Para evitar a formação de emulsão foi adicionado 1 g de cloreto de sódio. As fases orgânicas foram reunidas e então adicionou-se sulfato de sódio para remover a água residual. Os extratos orgânicos foram analisados por cromatografia gasosa.

4.4 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS CAPAZES DE DEGRADAR DERIVADOS DE PETRÓLEO

Foram coletadas amostras de água residuária nas proximidades de uma distribuidora de combustíveis situada no bairro Nacional, zona norte da cidade de Porto Velho-RO, nas coordenadas geográficas: 8°43'45.59" S e 63° 55'02.32" W (Figura 15).

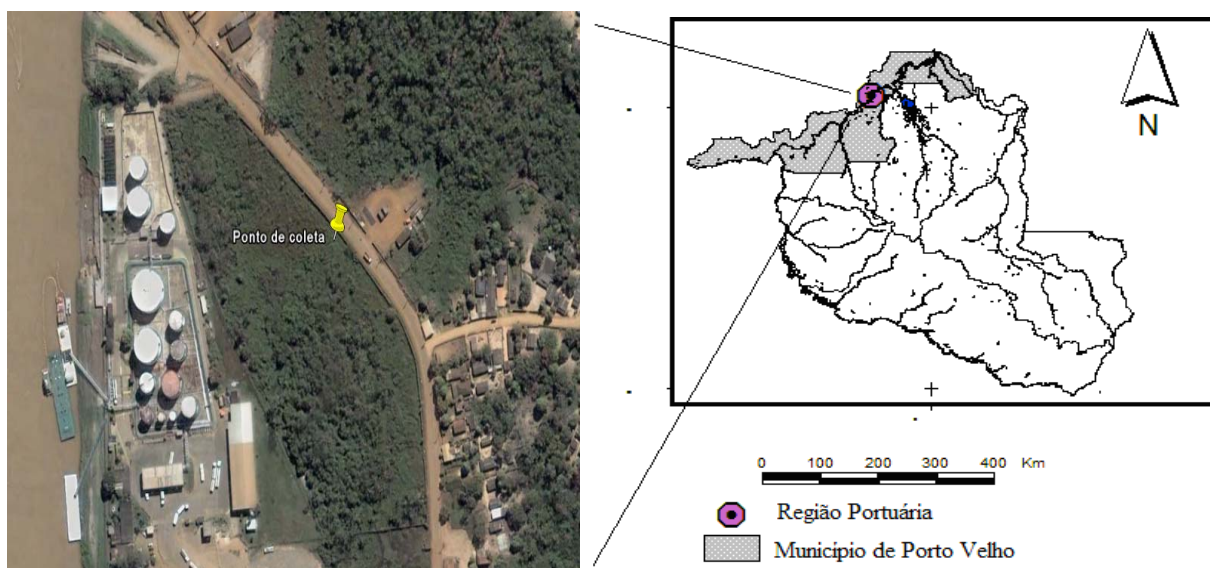


Figura 15. Área de estudo

4.4.1 Meio mineral inorgânico

Para um litro de água foram adicionados 1,36 g de KH_2PO_4 , 1,40 g de Na_2HPO_4 , 0,30 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,8 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2,75 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,7 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,325 mg CoCl_2 , 0,235 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,17 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SAKATA et al, 2004). O meio foi esterelizado em uma autoclave por 15min a 121°C.

Este meio foi utilizado em todos os ensaios de biodegradação.

4.4.2 Consórcios microbianos

Preparou-se meio mineral inorgânico segundo o proposto por Sakata et al (2004), contendo 1000 ppm de diesel como única fonte de carbono. Foi adicionado 1 mL da amostra de água residuária (coletada nas proximidades de uma distribuidora de combustíveis, situada no bairro Nacional em Porto Velho – RO) em 200 mL de meio mineral no intuito de obter um meio de cultura seletivo para microrganismos com potencial em biodegradação desses compostos.

A presença de microrganismos foi avaliada através do crescimento das populações microbianas na presença de diesel e gasolina como fonte de carbono.

Os meios de cultura foram mantidos sob agitação de 142 rpm e 28°C em uma incubadora do tipo *shaker* e realizado medidas de crescimentos dos microrganismos de 24 a 24 horas para avaliar sua curva de crescimento. Apartir da obtenção da fase estacionária do crescimento microbiano foram feitas sucessivas transferências a cada 120 horas, para selecionar os mais resistentes, onde estes ficaram incubados em uma incubadora (SHAKER) rotatória, sob agitação e temperatura constantes, aproximadamente 142 rpm e 28°C, respectivamente.

A taxa de crescimento e enriquecimento de cultura foi avaliada por espectrofotometria de UV-VIS, com escaneamento em 600nm.

Foi adotada a mesma metodologia para a seleção de microrganismos na presença de gasolina.



Figura 16. Meios de cultura: microrganismos crescendo na presença de gasolina à esquerda e na presença de diesel à direita.

4.5 TESTES LABORATÓRIAS PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO

4.5.1 Diesel

Para a elaboração dos ensaios de biodegradação foram preparados bioensaios em frascos de 50 mL contendo 20 mL de meio mineral inorgânico com diesel a 1000 ppm e 200 μ L de inóculo microbiano do meio de cultura da sétima transferência (MCD₇), sendo que foram montados dois grupos: um grupo teste (com inóculo microbiano) e um grupo controle (sem inóculo microbiano). Todos os testes foram efetuados em triplicata.

4.5.2 Gasolina

Para a elaboração dos ensaios de biodegradação foram preparados bioensaios em frascos de 50 mL contendo 20 mL de meio mineral inorgânico com gasolina a 1000 ppm e 200 μ L de inóculo microbiano do meio de cultura da sétima transferência (MCG₇), sendo que foram montados dois grupos: um grupo teste (com inóculo microbiano) e um grupo controle (sem inóculo microbiano). Todos os testes foram efetuados em triplicata.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

Os cromatogramas obtidos no cromatógrafo a gás foram convertidos através *software Shimatzu GC-10* em arquivos *ascii*, contendo para cada amostra os tempos de retenção e correspondentes intensidades detectadas no FID. Cada cromatograma contém 12000 pontos correspondendo à resolução de 0,003334 minutos. Para a análise de dados, através de análise por componentes principais, o período entre 8,33 e 26,66 minutos foi selecionado, pois não foram identificados sinais, picos cromatográficos, fora deste intervalo. A resolução usada para análise de dados foi de 0,01 minutos, resultando para cada amostra um cromatograma de 2751 pontos. As intensidades no FID referentes a estes pontos foram transferidas em matrizes onde cada linha representa uma amostra.

Para o diesel foi obtida uma matriz com 24 linhas e 2751 colunas sendo 12 para amostras controle e 12 para amostras do experimento de biodegradação. Para a análise de componentes principais as amostras foram pré-processadas centrando na média. Neste caso, um cromatograma médio é calculado e então subtraído dos cromatogramas originais. A matriz resultante desta subtração é aquela usada para a análise de componentes principais.

Os gráficos para avaliação de escores resultantes da análise componentes principais e cromatogramas foram obtidos através do pacote ‘Lattice’ do R. Os gráficos de escores foram efetuados através de ‘boxplots’, que representam a distribuição das triplicatas em cada tempo de monitoramento. Os ‘boxplots’ apresentam os valores do primeiro e quarto quartis (25 e 75% da variação de cada grupo) representados pelos ‘limites da caixa’. A mediana é indicada pelo ‘ponto central’ e valores máximo e mínimo dos dados pelos traços externos a caixa. O programa R foi usado para análise de dados.

4.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MICROBIANA DO CONSÓRCIO (MCD₇)

4.7.1 Isolamento

Foi preparado um meio de cultura de manutenção Nutriente Ágar (NA), que é um meio de cultura para o crescimento de microrganismos menos exigentes quanto a composição nutricional conforme Ribeiro & Soares (1993), e contém (g.L⁻¹ de água destilada) 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona de carne, 15,0 g de ágar-ágar. Foram utilizados produtos da marca Vetec.

Adicionou-se água aos ingredientes devidamente pesados até dissolvê-los e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos, em autoclave da marca Bio Eng, modelo A 50.

Verteu-se este meio em placas de Petri e adicionou 100µL do consórcio microbiano MCD₇ neste meio, adicionou-se 30µL de óleo diesel, fez o espalhamento do consórcio utilizando-se da Alça de Drigalsky e incubou os microrganismos em uma estufa D.B.O. da marca Eletrolab, modelo 101M/1, a 32°C por um período de dois dias. Após o surgimento das colônias deu-se início ao isolamento através da técnica de esgotamento por estrias.

4.7.2 Identificação molecular bacteriana

A identificação molecular foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biológicas - ICB II da Universidade de São Paulo – USP sob coordenação da professora Dra. Vivian Helena Pellizari.

Para a identificação molecular realizou-se primeiramente a extração do DNA das amostras bacterianas isoladas, de acordo com metodologia proposta por Wilson (1989). As amostras de DNA extraídas foram submetidas a metodologia da reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação do DNAr 16S. Os fragmentos de DNAr 16S foram purificados e seqüenciados.

4.7.2.1 Extração de DNA genômico bacteriano

4.7.2.1.1 Soluções

4.7.2.1.1.1 Tampão TE (Tris-EDTA, 10 mM Tris-HCL, pH 8.0 e 1 mM EDTA, pH 8.0)

Foi feita uma diluição das soluções estoques de Tris-HCL 1M e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, em H_2O . Para 50 mL utilizou 0,5 mL de Tris + 0,1 mL.

4.7.2.1.1.2 Solução SDS 10 % (Dodecil Sulfato de Sódio)

Para o preparo da Solução SDS 10 % foi Dissolvido 10 g de SDS em 100 mL de H_2O . A solução obtida será armazenada à temperatura ambiente.

4.7.2.1.1.3 Solução CTAB 10 % (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio) NaCl $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$

Em uma solução de NaCl $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ foi dissolvido 10 g de CTAB e em seguida a solução foi aquecida a 65°C para solubilizar completamente.

4.7.2.1.1.4 Solução proteinase K (20 mg.mL^{-1})

Para cada mg de proteinase K, dissolveu-se 20 mL de água para PCR ou Mili-Q.

Todas as soluções usadas em Biologia Molecular devem ser preparadas em água Milli-Q e autoclavadas, a não ser quando indicado.

4.7.2.1.2 Procedimento

Inicialmente foi feito uma raspagem das culturas bacterianas para *eppendorffs* de 2,0 mL, estes foram ressuspensos em 567 μL de TE. Adicionou-se em seguida 30 μL de solução 10 % SDS e 3 μL de solução de Proteinase K, os tubos foram agitados e incubados por 1h a 37°C em banho seco. Adicionou-se 100 μL de solução de NaCl, e logo em seguida após uma pequena

agitação, adicionou-se 80 μL de solução de CTAB pré-aquecido a 65 °C. Os tubos foram incubados por 20 min a 65 °C.

Deixou-se esfriar a temperatura ambiente e adicionou aproximadamente o mesmo volume de clorofórmio-álcool isoamílico, foi feita uma homogeneização por inversão, em seguida os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm em uma microcentrífuga, por 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. Foi removido a fase aquosa com o auxílio de ponteiras com filtro e transferido para novos *ependorffs* de 2 mL. Adicionou-se 3 μL de RNase A, e incubou-os por 30 minutos a 37 °C em banho seco; Foram adicionados igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico, onde os tubos foram homogeneizados novamente e centrifugados por 15 minutos a temperatura ambiente; A fase aquosa foi removida e transferida para novo tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 0,6 X (60 %) de isopropanol gelado, homogeneizou-os por inversão e centrifugou a 12.000 rpm por 20 min a 4 °C em uma centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 μL de etanol 70 %, centrifugou-se novamente a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Retirou-se todo o etanol 70 % com pipeta e deixou os tubos sobre a bancada para secar. O DNA foi ressuspendido com mais 30 μL de TE.

4.7.2.2 Medidas da concentração do DNA

As medidas da concentração do DNA foram feitas no espectrofotômetro de marca Nano Drop. Estas medidas servem para avaliar a quantidade de DNA extraído da amostra. Para medir as concentrações, são colocados 2 μL do DNA extraído das amostras no sensor do espectrofotômetro. O controle utilizado foi a solução de TE. Valores de concentrações acima de 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ são considerados boas extrações.

4.7.2.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

4.7.2.3.1 Procedimento

A sequência a ser replicada do DNAr foi referente ao gene 16 S, que é característico para a identificação bacteriana. Foram utilizados os primers 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') e 1401R(5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG3'). Todo o material utilizado para a PCR foi levado para a capela para PCR e deixados na UV

durante 15 minutos, com exceção da Taq polimerase. Os reagentes utilizados para a amplificação do DNA, como as concentrações iniciais, finais, o volume utilizado para cada reação e o volume a ser preparado para todas as reações estão listados na tabela 5. Foram preparadas uma quantidade de volume de reagentes para um total de 10 amostras, e em seguida estas foram distribuídas para 10 *ependorffs* com um volume de 23 µL e mais 2 µL do DNA extraído de cada amostra totalizando um volume final de 25 µL em cada *ependorff*.

Tabela 5. Volume dos reagentes para a PCR.

16S (Bactéria)	Conc. Inicial	Conc. Final	vol. reação (µL)	Nº de reações (µL)
27F-1401R			25	10
PCR buffer	10 X	1 X	2,50	25,00
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75	7,50
dNTPs	100 mM	0,8 mM	0,20	2,00
primer 27F	20 mM	0,2 mM	0,25	2,50
primer 1401R	20 mM	0,2 mM	0,25	2,50
Taq Pol	5 U/mL	1 U/50 mL	0,10	1,00
DNA			2,00	
H ₂ O			18,95	189,50

As amplificações realizadas foram feitas com o uso de um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). A reação foi iniciada por 5 minutos de desnaturação a 94° C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos, extensão a 72° C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final a 72° C por 7 minutos. O controle positivo utilizado foi o DNA da *Escherichia coli*.

4.7.2.4 Eletroforese

Após a PCR, foi feita a eletroforese para visualizar a amplificação do DNA. O gel utilizado é composto por 1% (1 g) de agarose para 100 mL de TAE 1X (Tris, EDTA, ácido acético).

Para a corrida no gel, foram misturados: 2 µL de xileno cianol, 4,5 µL de TAE 1X e 2,5 µL das amostras. Estas foram colocadas nos poços do gel e utilizado o marcador 1 KB Plus DNA Ladder™ (*Invitrogen Life Technologies*) em quantidade de 5 µL, para marcar a corrida. Após a corrida o gel foi colocado no brometo de etídio por 10 minutos e em seguida colocado em água. Foi tirada a foto do produto de PCR, utilizando-se de uma máquina fotográfica com luz UV da marca Kodak.

4.7.2.5 Purificações do produto de PCR e seqüenciamento das amostras

Para que as amostras sejam seqüenciadas é necessário que o produto de PCR seja purificado, para esta purificação utilizou-se do quite de purificação *Invitrogen PureLink PCR Purification kit*. Em seguida fez-se a leitura do DNA purificado no espectrofotômetro e a eletroforese deste produto de PCR purificado, utilizando para o gel, 2 % de agarose para 100 mL de TAE 1X. O marcador utilizado para o Produto de PCR purificado foi o *Low mass (Invitrogen Life Technologies)*.

As reações de seqüenciamento já purificadas foram aplicadas no seqüenciador Megabace 1000 da GE Halthcare. As análises foram feitas pelo Software *Sequence Analyser 3.0* com *basecaller Cimerron 3.12*. Os resultados foram analisados no programa *BioEdit (Sequence Alignment Editor)* e comparação em bancos de dados internacionais *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando-se da ferramenta do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para a identificação dos microrganismos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS MICROBIANOS

Durante obtenção dos consórcios microbianos foram realizadas medidas de crescimento a cada 24 horas para verificar o desenvolvimento dos microrganismos na presença de gasolina, diesel e BTXs e foi verificado que após 96 e 120h o crescimento microbiano na presença de gasolina e diesel, respectivamente, permanecia constante ou apresentava um pequeno crescimento (Figura 17). Nota-se que os microrganismos obtiveram um melhor desempenho quando utilizado diesel como fonte de carbono e um desempenho baixo quando utilizado BTXs como fonte de carbono, fato esse explicado pela alta toxicidade dos compostos BTXs e a presença de compostos tóxicos, aos microrganismos, em maior concentração na gasolina em relação ao diesel (BRITON, 1984; BARKER & HERSON, 1994; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

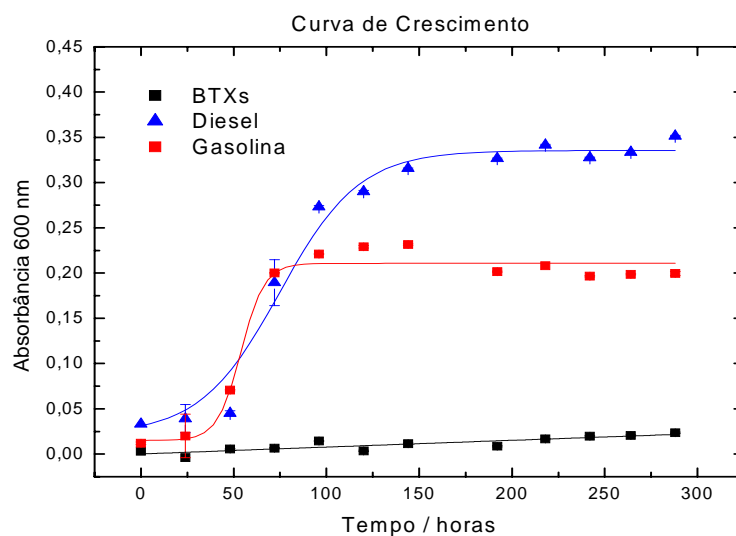


Figura 17. Medidas de crescimento dos microrganismos a 600 nm.

5.2 ESTUDOS DE BIODERGRADAÇÃO DO DIESEL

Para o estudo de biodegradação do diesel foi utilizada uma concentração inicial de 1000 ppm em meio líquido em ambiente laboratorial. O monitoramento do processo de biodegradação utilizando a microextração em fase sólida sendo a fibra recoberta com polidimetilsiloxane/divinil benzeno revela a biodegradação de componentes do diesel pelo consórcio de microrganismo. Os ensaios foram realizados ao longo de 21 dias, sendo que o monitoramento nos dias 3, 7, 14 e 21.

5.2.1 Estudos de biodegradação de diesel monitorados por CG-FID

As análises efetuados com o CG-FID serviram para monitorar a degradação total dos hidrocarbonetos presentes no diesel.

Avaliando os perfis cromatográficos das análises do *headspace* através de microextração em fase sólida (Figura 18), pode ser observado que o consórcio de microrganismos efetuou a degradação dos compostos do diesel ao longo dos 21 dias monitorados, em especial para série homóloga de hidrocarbonetos de cadeia linear.

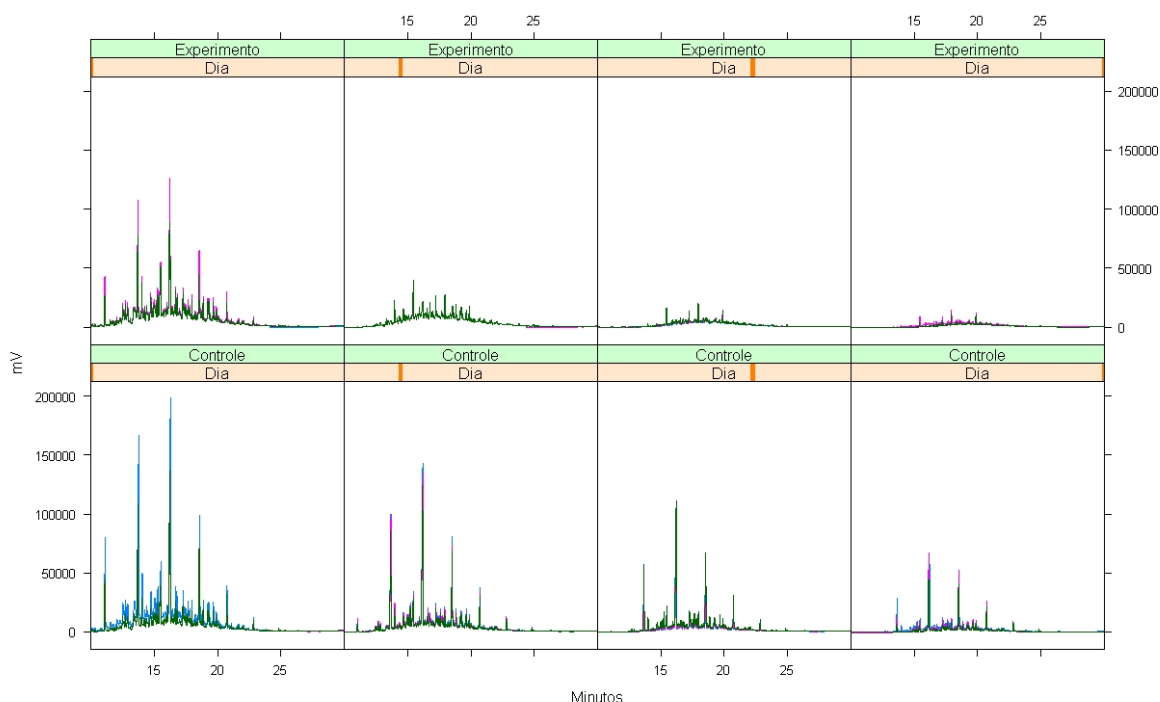


Figura 18. Perfis cromatográficos dos ensaios (meio de cultura com microrganismo) e controle (meio de cultura estéril). Da esquerda para direita cada coluna apresentam triplicatas efetuadas com 3, 7, 14 e 21 dias após a adição do diesel a 1000 ppm.

Outro fato importante, observado na figura 19, mostra que compostos constituintes da série homóloga de hidrocarbonetos são aqueles degradados mais rapidamente. Nesta figura é ilustrado o processo em estudo, onde compostos do diesel apresentam equilíbrio entre a fase gasosa (aquela monitorada com o SPME) e o meio de cultura onde ocorre a biodegradação (no caso dos ensaios). No caso do controle (coluna à esquerda na figura 19) é observado que parte dos compostos da série homóloga são perdidos por vaporização que se mantém no *headspace* até o dia 21. No entanto, nos ensaios (coluna à direita na figura 19) os compostos da série homóloga não são observados no dia 21. Isto é uma forte indicação de que os compostos foram biodegradados e não apenas perdidos por vaporização, visto que segundo Spinelli (2005) vaporização e biodegradação atuam em conjunto. O desvio da linha base devido a compostos sobrepostos em direção a tempos maiores de retenção indica que compostos observados em maiores tempos de retenção passam a predominar o cromatograma. Isto indica que outros compostos além daqueles de cadeia linear (série homóloga) também estão sendo biodegradados. Da esquerda para direita cada coluna apresenta media efetuadas com 3, 7, 14 dias após a adição

do diesel a 1000 ppm. Nestes gráficos as escalas de intensidade são diferentes, ou seja, as mesmas informações descritas na figura 18 são apresentadas, mas possibilitando a identificação dos detalhes de cada corrida cromatográfica.

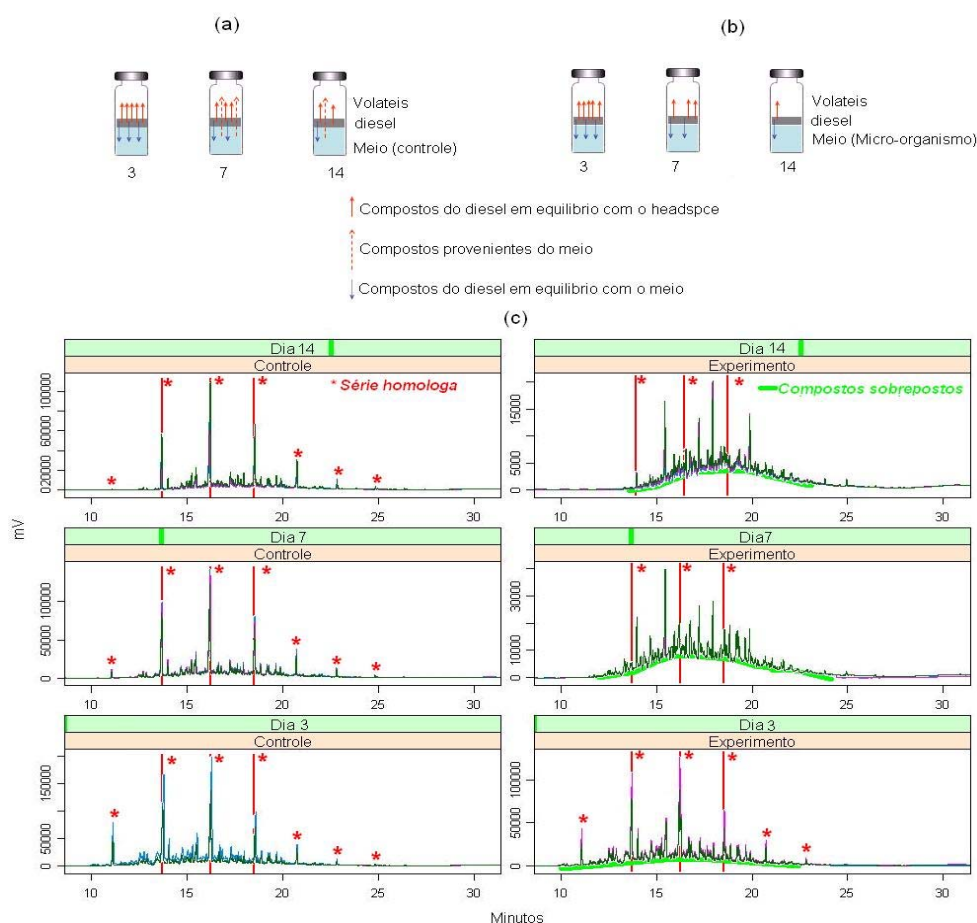


Figura 19. Perfis cromatográficos dos ensaios dando destaque para os hidrocarbonetos de série homóloga e a formação de UCM do grupo experimento.

A relação entre análises cromatográficas dos ensaios de biodegradação e controle foi também investigada através de Análise por Componentes Principais. Os dados foram centrados na média, ou seja, cada cromatograma foi subtraído da média de todos os cromatogramas. O programa R (versão 2.6.0, de 03/10/2007, The R Foundation for Statistical Computing) foi empregado na análise por componentes principais. A tabela 6 apresenta a variância explicada dos 5 componentes principais mais importantes. Os dois primeiros componentes, que explicam a maior parte da variação dos dados, estão relacionados aos processos de decaimento devido à

vaporização e possivelmente á biodegradação. Isto é sugerido devido ao decaimento dos escores em função do período de degradação. A figura 20 mostra que controle e experimento apresentam decaimento similar no primeiro componente principal, mas no segundo este decaimento é distinto. Isto sugere que o segundo componente principal informa sobre a diferença entre controle e experimento. Os *loadings* deste segundo componente principal (Figura 21) indicam que esta diferença esta relacionada aos perfis cromatográficos da série homóloga de hidrocarbonetos.

Tabela 6. Análise de componentes principais dos dados de diesel.

	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4	Comp.5
Variância explicada (%)	60	22	8	4	2
Variância explicada acumulada (%)	60	82	90	94	96

A figura 20 apresenta os escores oriundos da Análise de Componentes dos dados de diesel. Cada ‘boxplot’ representa triplicatas do experimento e controle efetuadas nos dias 3, 7, 14 e 21. Os escores dos cinco componentes principais mais importantes (60%, 22%, 8%, 4%, 2%, respectivamente), que representam 96% da variância explicada, são apresentados.

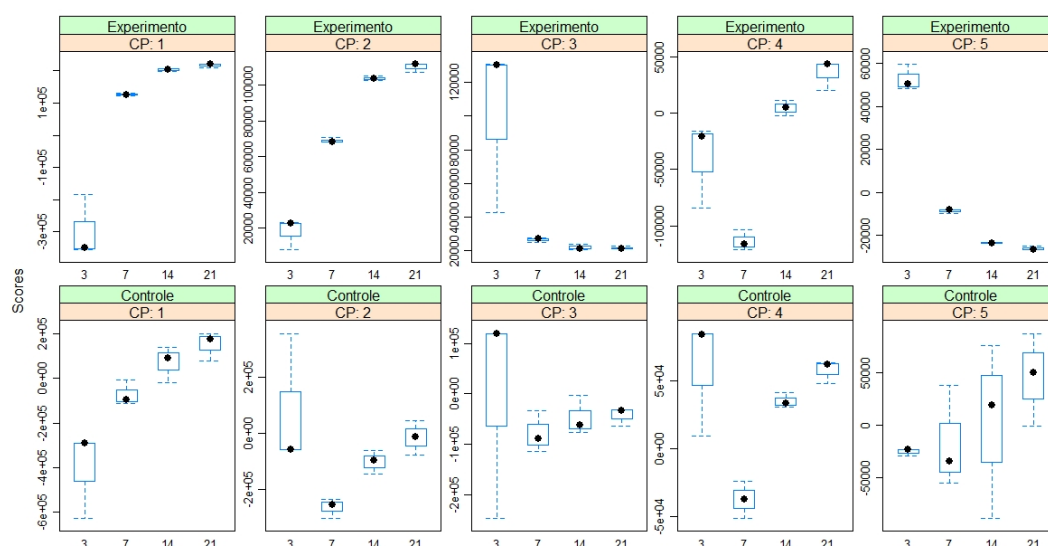


Figura 20. Escores oriundos da Análise de Componentes dos dados de diesel.

Na figura 21 podem ser observado os *loadings* oriundos da Análise de Componentes dos dados de diesel. Os *loadings* dos cinco componentes principais mais importantes (60%, 22%, 8%, 4%, 2%, respectivamente), que representam 96% da variância explicada, são apresentados em função do tempo de retenção.

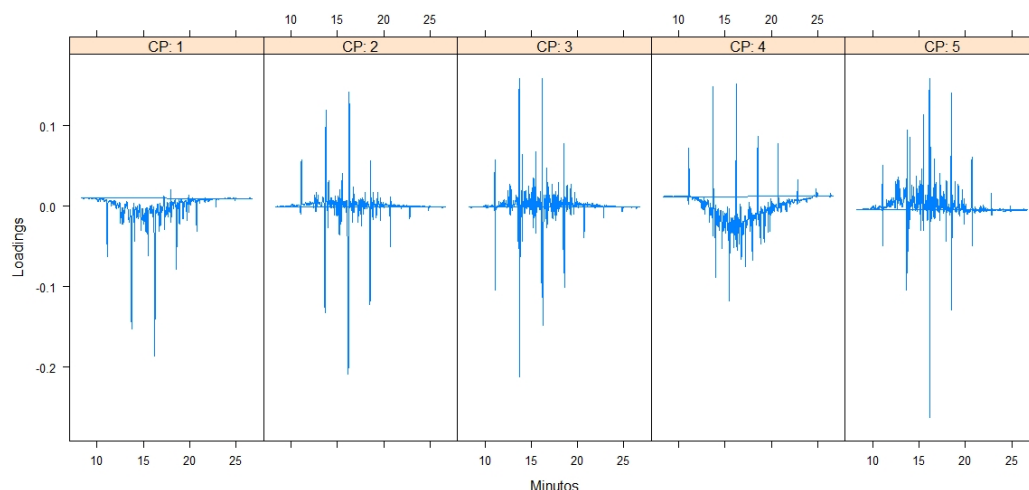


Figure 21. *Loadings* oriundos da Análise de Componentes dos dados de diesel.

5.2.2 Estudos de biodegradação de diesel monitorados por CG/MS

O uso do CG/MS foi empregado no início e no fim dos ensaios de biodegradação do diesel com o intuito de avaliar quais compostos eram degradados inicialmente e identificá-los, além de avaliar também, os mais difíceis de serem degradados (recalcitrantes). As fragmentações dos espectros de massas são muito ricas em informações estruturais, sendo assim, foram particularmente úteis para identificação dos compostos da fração volátil do diesel.

O monitoramento inicial e final é de suma importância, visto que outros processos como volatilização, também influencia na perda de compostos nas matrizes.

Avaliando os resultados do monitoramento da biodegradação de diesel a 1000 ppm, nota-se que no início do monitoramento observa-se uma redução dos compostos, mas não um desaparecimento completo de alguns picos, fato este também diagnosticado nos ensaios monitorados por CG-FID. A figura 22 apresenta o perfil cromatográfico dos ensaios de biodegradação de diesel a 1000 ppm no 3º dia de monitoramento.

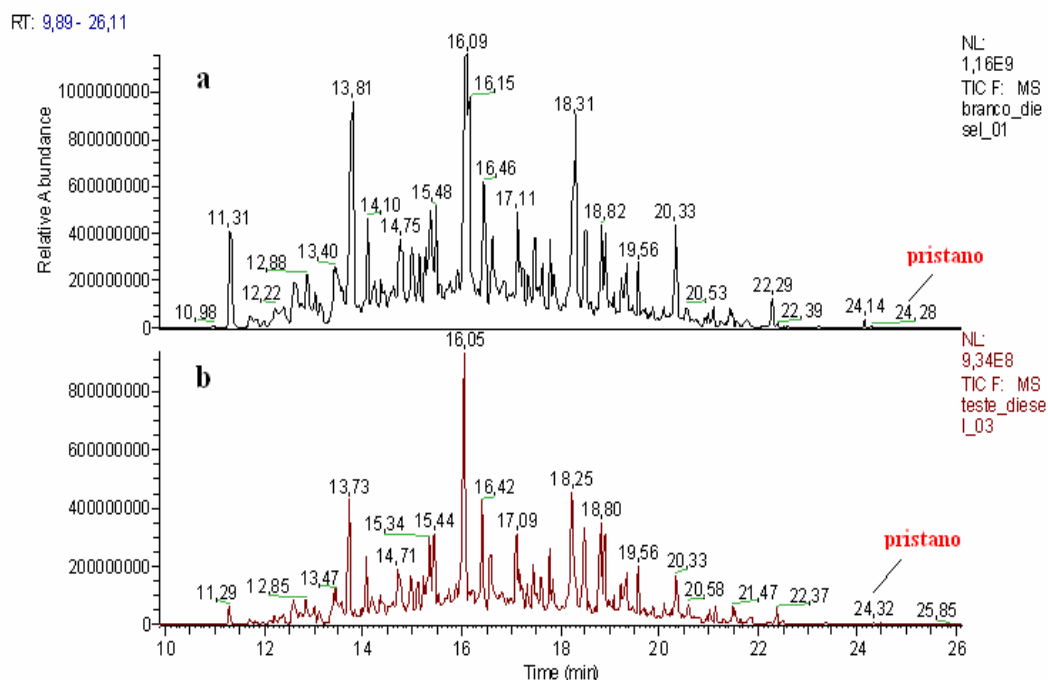


Figura 22. Perfil cromatográfico da biodegradação de diesel a 1000 ppm por CG/MS. (a) representa os controles e (b) os ensaios.

No final do monitoramento da biodegradação, pode-se perceber uma degradação significativa dos compostos presentes no diesel pelo consórcio microbiano. A figura 23 demonstra o perfil cromatográfico do monitoramento do 21º dia da biodegradação de diesel a 1000 ppm. Nota-se que a escala da abundância relativa na figura 23b foi ampliada para facilitar a visualização.

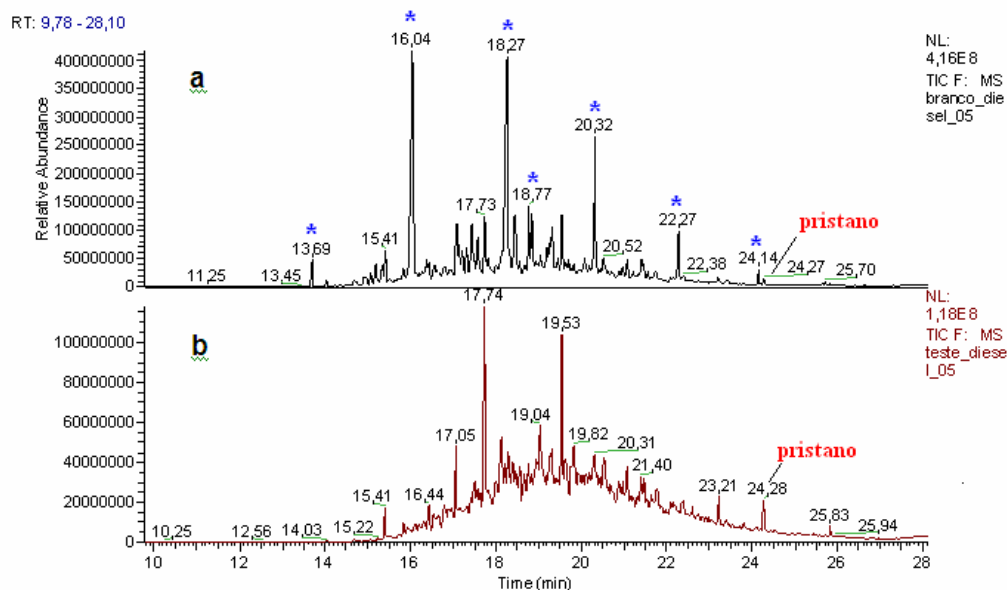


Figura 23. Perfil cromatográfico referente ao monitoramento do 21º dia da biodegradação de diesel a 1000 ppm. (a) controle e (b) ensaio de degradação.

Observando a figura 23 nota-se o desaparecimento de alguns compostos presentes nos ensaios de biodegradação, fato este comprovado pelo decaimento das intensidades das áreas emitidas que estão diretamente relacionados às concentrações dos compostos. Avaliando a figura 23b, percebe-se a degradação dos picos com tempo de retenção (Tr): 13.69 min, 16.04 min, 18.26 min, 18.77 min, 20.32 min, 22.27 min e 24.14 min, enquanto que os compostos com tempo de retenção (Tr): 15.41 min, 17.05 min, 17.74 min, 19.53 min, 23.21 min e 24.28 min, mostraram-se persistentes.

5.2.3 Identificação dos compostos do diesel por espectrometria de massa (MS)

Os resultados obtidos a partir do monitoramento do 21º dia da biodegradação de diesel (1000 ppm) por CG/MS (Figura 23) revela as estruturas dos compostos que foram degradados e também dos compostos que permaneceram recalcitrantes nas condições avaliadas. A relação dos compostos por tempo de retenção está apresentada na tabela 7. As estruturas foram identificadas por estudo dos espectros de massas, comparação com o espectro de massas do banco de dados NIST e índice de retenção similarmente ao que foi descrito para gasolina.

Tabela 7. Relação dos compostos identificados no *headspace* dos ensaios com diesel por espectrometria de massa.

Pico (TR min)	IR calculado	IR literatura	Composto	Massa molar
13.69	1200	1200	<i>n</i> -Dodecano	170
15.41	1272	-	2,6,10-undecane	198
16.04	1300	1300	<i>n</i> -Tridecano	184
17.05	1350	1345 ^a	Heptil-ciclohexano	182
17.74	1385	1375 ^b	2,6,10-trimetil- dodecano	212
18.27	1400		<i>n</i> -Tetradecano	198
18.77	1433	1427 ^c	1,6-dimetil-naftaleno	156
19.53	1469	1462	2,6,10trimetil- tridecano	226
20.32	1500	1500	<i>n</i> -Pentadecano	212
22.27	1600	1600	<i>n</i> -Hexadecano	226
24.14	1700	1700	<i>n</i> -Heptadecano	240
24.28	1708	1707	2,6,10,14-tetrametil- pentadecano (pristano)	268

Obs.: estão descritos apenas os compostos em caráter majoritário.

^a (KALLIO *et al*, 2006), ^b (KONIG *et al*, 2006), ^c (SANDERCOCK *et al*, 2003).

Com base nos resultados percebe-se que os microrganismos tiveram uma preferência por hidrocarbonetos lineares: *n*-Dodecano, *n*-Tridecano, *n*-Tetradecano, *n*-Pentadecano, *n*-Hexadecano e *n*-Heptadecano. Isso se deve ao fato da presença de ramificações na molécula de alcano dificultarem a β -clivagem e conseqüentemente dificultar biodegradação da molécula. O pristano (Tr= 24.28), por exemplo, apresentou-se resistente à biodegradação devido as suas ramificações. O composto com tempo de retenção Tr= 18.77 identificado como 1,6-dimetil-naftaleno, apesar de ser um composto aromático, foi degradado pelo consórcio após 21 dias de monitoramento.

5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MICROBIANA DO CONSÓRCIO MCD₇

Após o surgimento das colônias deu-se início ao isolamento através da técnica de esgotamento por estrias. Foram isoladas 5 cepas microbianas (Figura 24).

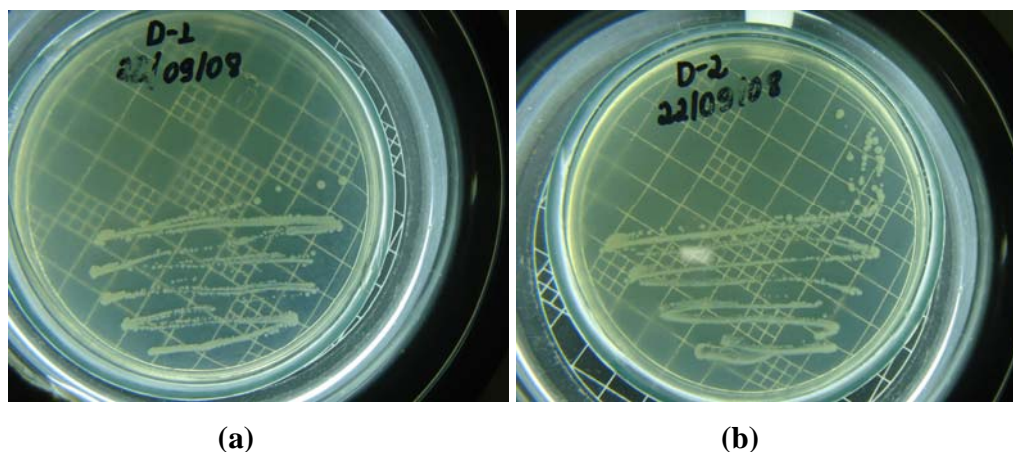


Figura 24. Placa de cultura microbiana D-1 (a) e Placa de cultura microbiana D-2 (b).

As análises de extração do DNA, PCR e purificação do produto de PCR tiveram bons resultados, o que foi fundamental para que todas as amostras fossem seqüenciadas. O seqüenciamento exige que as amostras estejam com uma boa concentração do produto de PCR purificado superiores a 20 μL e um boa amplificação vista no gel (Figura 25). As concentrações do DNA purificados foram medidas no espectrofotômetro e são mostradas na tabela 8.

Tabela 8. Leitura da Concentração do Produto de PCR purificado.

Amostra	Concentração em $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
MCD ₇ – 1	95,6
MCD ₇ – 2	72,4
MCD ₇ – 3	66,8
MCD ₇ – 4	78,7
MCD ₇ – 5	77,6

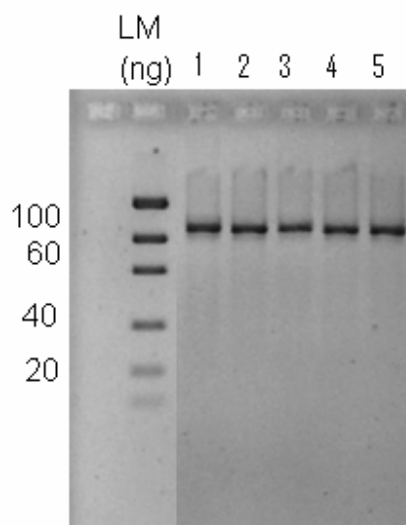


Figura 25. Gel do produto da PCR purificado.

Através do sequenciamento e dos testes bioquímicos, pode-se identificar 5 cepas isoladas que participam da biodegradação do diesel, sendo que todas foram identificadas como *Acinetobacter Baumannii*.

Na tabela 9 apresenta maiores informações sobre estes resultados, tais como: número de acesso do *Gen Bank*, porcentagem de similaridade da sequência, referência da cultura co-relatada, número de pares de base seqüenciados.

Tabela 9. Identificação molecular das culturas isoladas, tendo como tamanho da seqüência 1400 pares de base (pb).

Amostra	GenBank accession number	Tamanho da sequencia (pb)	Cultura relatada	% similaridade sequencia	Referência
MCD ₇ -1	NC_010611.1	1400	<i>Acinetobacter Baumannii</i>	97	IACONO et al, 2008
MCD ₇ -2	NC_010611.1	1400	<i>Acinetobacter Baumannii</i>	97	IACONO et al, 2008
MCD ₇ -3	NC_010611.1	1400	<i>Acinetobacter baumannii</i>	97	IACONO et al, 2008
MCD ₇ .4	NC_010611.1	1400	<i>Acinetobacter Baumannii</i>	97	IACONO et al, 2008
MCD ₇ -5	NC_010611.1	1400	<i>Acinetobacter Baumannii</i>	97	IACONO et al, 2008

Um dos desafios para se promover a biorremediação no Brasil é a descoberta de cepas bacterianas em nossos biomas com capacidade em degradar os compostos tóxicos. A *Acinetobacter Baumannii* é uma conhecida degradadora e a descoberta em amostra de água na região Amazônica é de grande importância.

O gênero *Acinetobacter* está amplamente citado na literatura como potencial assimilador de hidrocarbonetos derivados de petróleo (LEHY & COLWELL, 1990; CHAINEAU et al, 1999; GALLEG0 et al, 2001).

Resultados obtidos por Mishra et al (2004) e por Moraes & Tauk-tornisielo (2004) comprovam, também, a eficiência da *Acinetobacter Baumannii* como microrganismo com grande potencial para biodegradação de compostos tóxicos como hidrocarbonetos derivados de petróleo.

5.4 ESTUDOS DE BIODEGRADAÇÃO DA GASOLINA

Para o estudo da biodegradação da gasolina foi selecionada uma concentração inicial de 1000 ppm. O monitoramento do processo de biodegradação foi realizado utilizando a microextração em fase sólida sendo a fibra recoberta com polidimetilsiloxane/divinil benzeno, estes polímeros apresentam baixa polaridade, sendo indicado, portanto, principalmente, para extração e pré-concentração de compostos apolares. O monitoramento foi realizado com um intervalo de 3, 8 e 15 dias.

Os ensaios de biodegradação foram realizados em frascos de 50 mL como descrito na metodologia. Os experimentos controles foram preparados com a mesma concentração e sem a adição de inóculo microbiano. O uso dos controles abióticos teve como objetivo principal avaliar as perdas por evaporação, visto que durante os ensaios laboratoriais da biodegradação o intemperismo atua fortemente nos dois sistemas. A extração dos compostos voláteis foi por microextração em fase sólida baseada na partição desses compostos entre a fase aquosa e a fase gasosa (*Headspace*).

5.4.1 Estudos de biodegradação de gasolina monitorados por CG-FID

As análises efetuados com o CG-FID serviram para monitorar a degradação total dos hidrocarbonetos presentes na gasolina.

Os resultados obtidos a partir das análises cromatográficas por CG-FID (Figura 26) indicam um total desaparecimento dos compostos voláteis no 15º dia de monitoramento, que pode estar relacionado com a capacidade do consórcio microrbiano em degradar componentes da gasolina.

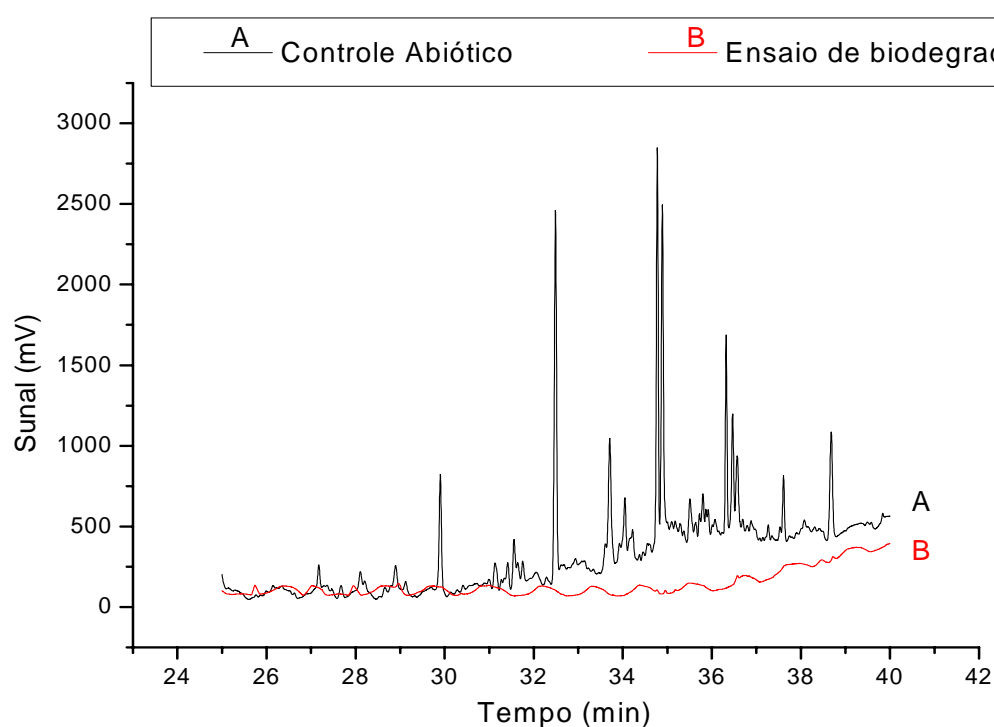


Figura 26. Cromatograma do Monitoramento do 15º dia da biodegradação de gasolina a 1000 ppm. Grupo controle em preto e experimento de degradação em vermelho.

Os dados obtidos também foram plotados em escala logarítmica da área total média de três replicatas dos cromatogramas versus dias de análises (Figura 27).

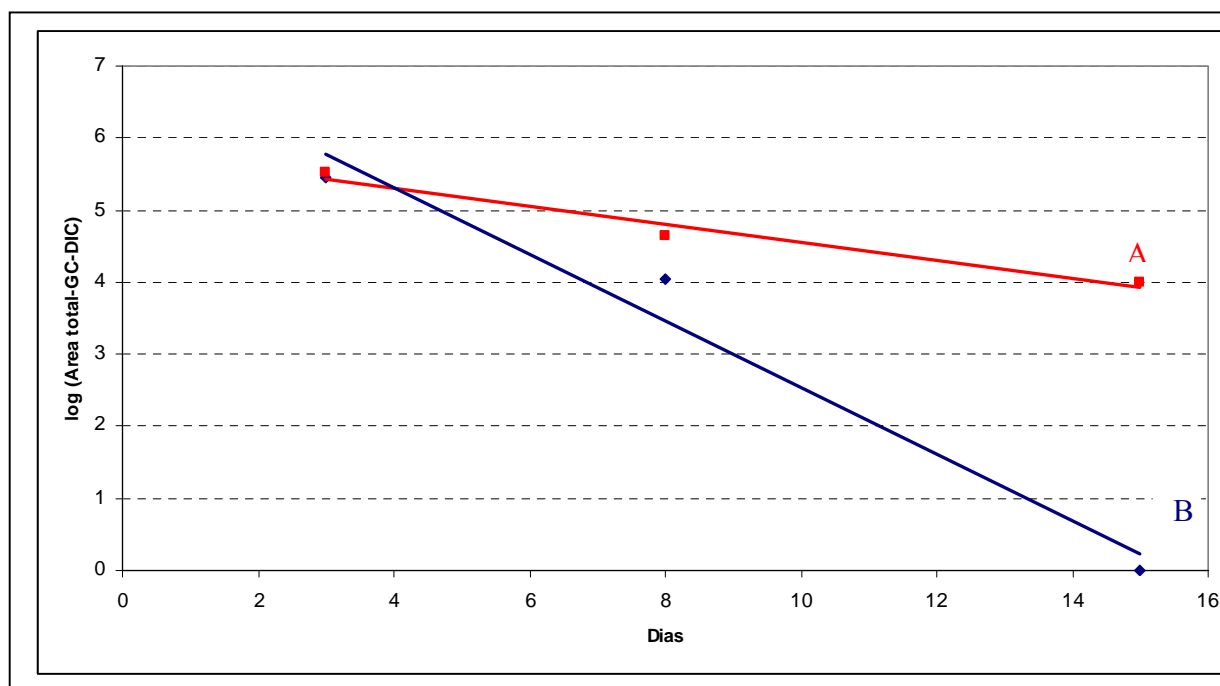


Figura 27. Monitoramento do processo de biodegradação de gasolina, 3, 8 e 15 dias. Legenda: (B) Barras azuis – Experimento de biodegradação (consórcio de microrganismos). (A) Barras vermelhas – Experimento controle (abiótico).

Os ensaios com a gasolina apresentaram como principal dificuldade a alta taxa de vaporização. Os resultados apresentados sugerem que os microrganismos biodegradaram os compostos da gasolina. Neste caso, e nestas condições, a biodegradação é sugerida para compostos com maiores tempos de retenção e menos voláteis.

A volatilização é um dos processos naturais que auxiliam a remoção de hidrocarbonetos de áreas poluídas (JOHNSON, 1998).

Resultados semelhantes foram observados em Frankenberger (1992) onde foi constatado que a volatilização e a biodegradação atuam em conjunto, e tendem a remover seletivamente as frações de hidrocarbonetos mais leves. Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que os microrganismos são capazes de biodegradar os compostos da gasolina, principalmente os hidrocarbonetos lineares de menor volatilidade. Foi observado o completo desaparecimento dos

hidrocarbonetos em um intervalo de 15 dias. Entretanto, é possível observar um grande efeito do intemperismo no controle abiótico causado pelo processo de volatilização dos componentes da gasolina, o que contribui também para o desaparecimento dos componentes nos ensaios de biodegradação. Esse é uma importante observação para não hiperestimar o processo de biodegradação.

5.4.2 Estudos de biodegradação de gasolina monitorados por CG/MS

O uso do CG/MS foi empregado no início e no fim dos ensaios de biodegradação da gasolina com o intuito de avaliar quais compostos eram degradados inicialmente e identificá-los, além de avaliar também, os mais difíceis de serem degradados (recalcitrantes). As fragmentações dos espectros de massas são ricos em informações estruturais, sendo assim, particularmente úteis.

O monitoramento inicial e final é de suma importância, visto que outros processos como volatilização, também influencia na perda de compostos nas matrizes.

Os resultados obtidos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas são similares aos descritos na literatura, observando o monitoramento do 3º dia da biodegradação de gasolina a 1000 ppm (Figura 28) nota-se a diminuição das concentrações dos compostos presentes na fração de destilação da gasolina.

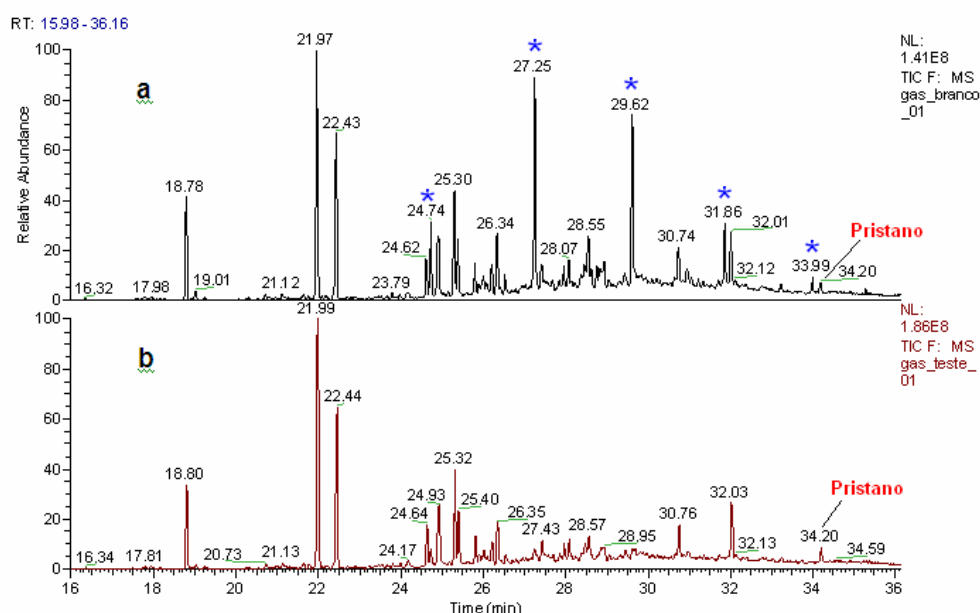


Figura 28. Perfil cromatográfico referente ao monitoramento do 3º dia da biodegradação de gasolina a 1000 ppm. (a) controle e (b) ensaio de degradação.

Ao observar a figura 28b pode-se verificar que houve a redução de alguns picos, avaliando os picos de alta intensidade, como é o caso dos compostos com tempo de retenção (Tr): 24.74 min, 27.25 min, 29.62 min, 31.86 min, 33.99 min. Os compostos com tempos de retenção (Tr): 18.8 min, 21.98 min, 22.44 min, 24.64 min, 24.93 min, 25.32 min, 25.40 min, 25.80 min, 26.20 min, 26.34 min, 30.70 min e 32.02 min não apresentaram redução significativa em suas concentrações, permanecendo recalcitrantes nestas condições.

5.4.3 Identificação dos compostos da gasolina por espectrometria de massa (MS)

Três séries de compostos (*n*-alcanos, poliaromáticos e isoprenóides) representam os principais constituintes da fração volátil da gasolina estudada. O espectro de massas de *n*-alcanos apresenta uma fragmentação característica mostrando um gradual declínio na abundância dos fragmentos com o aumento da massa (Figura 29). Uma outra característica desta classe de compostos é a presença de fragmentos com espaçamento de 14 unidades de massas correspondente a diferença de unidades de CH_2 , devido a perda de CH_2CH_2 unidades.

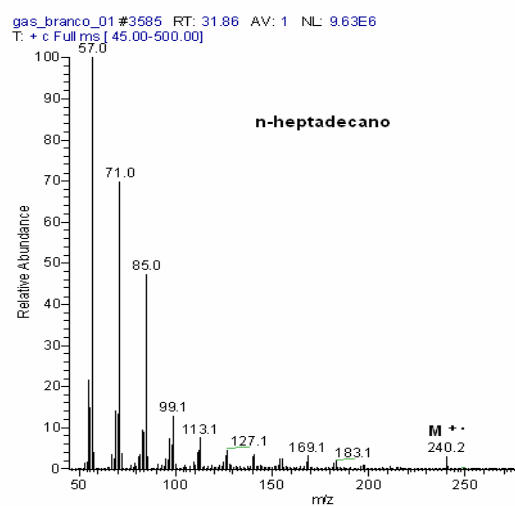
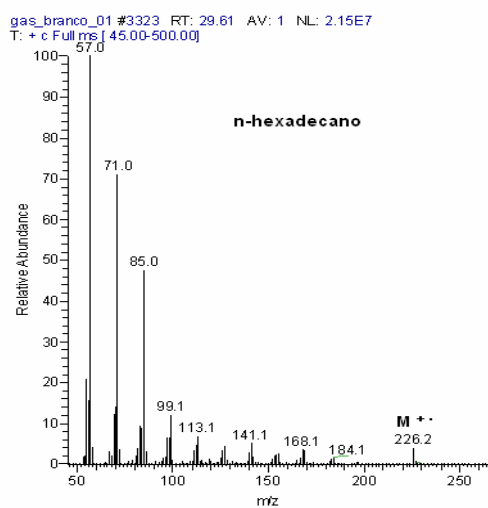
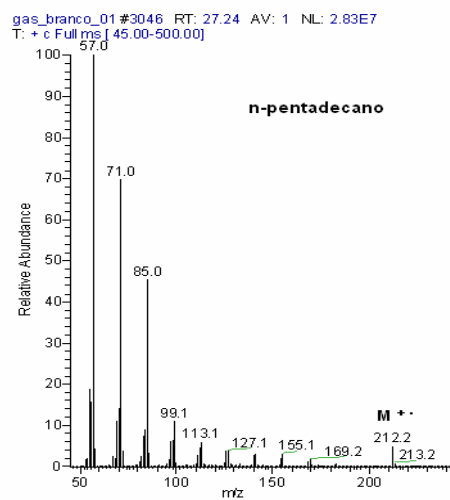
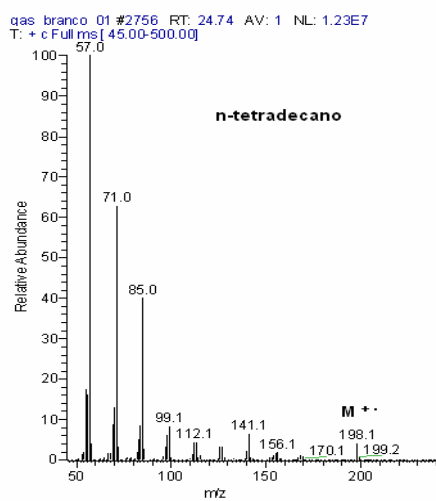


Figura 29. Espectro de massas de quatro n-alcanos presentes na fração volátil da gasolina estudada.

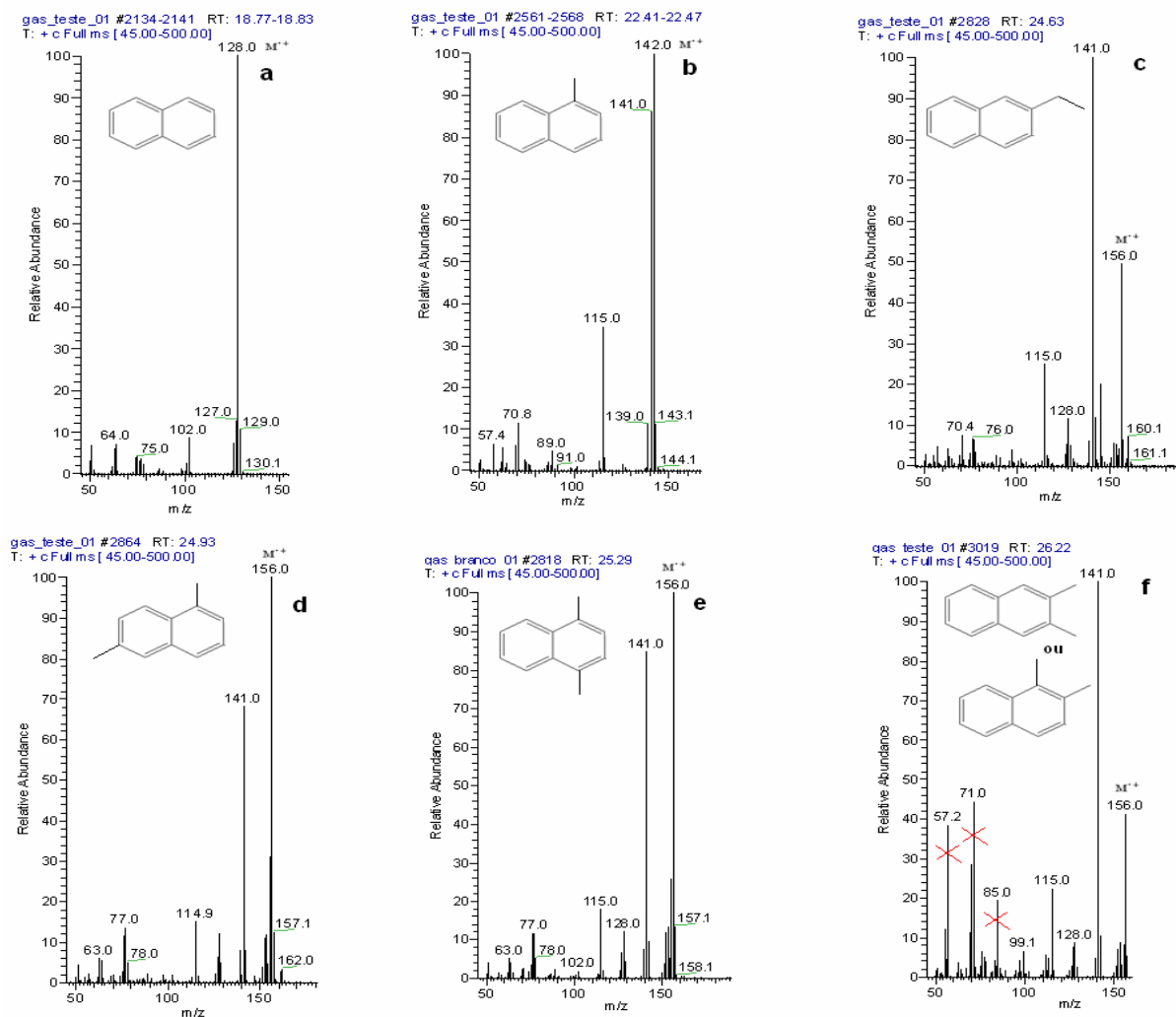


Figura 30. Espectro de massas de alguns compostos poliaromáticos presentes na fração volátil da gasolina estudada com as respectivas estruturas. a-naftaleno; b-1-metil-naftaleno; c-2-etil-naftaleno; d-1,6-dimetil-naftaleno; e-1,4-dimetil-naftaleno; f-1,2-dimetil-naftaleno ou 2,3-dimetil-naftaleno. Obs. Picos de m/z 57, 71 e 85 (f) são provenientes da sobreposição com n-alcanos.

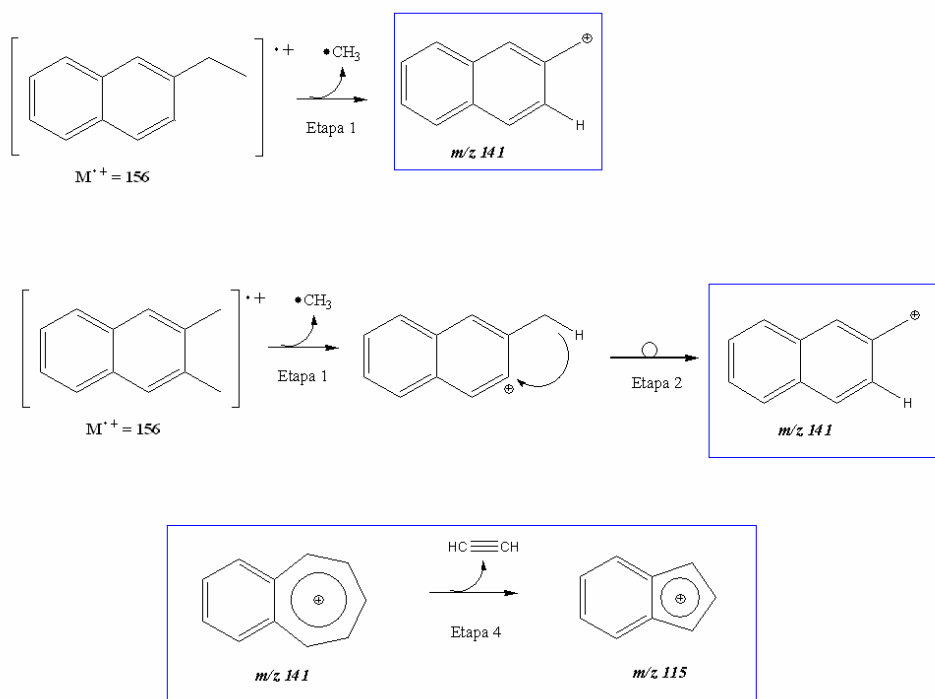


Figura 31. Mecanismo de fragmentação do 2,3- (e 1,2-)-dimetil-naftaleno e 1-(e 2-)-etil-naftaleno.

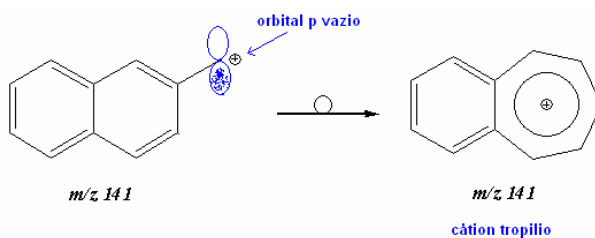


Figura 32. Rearranjo para formação do cátion tropílio.

O espectro de massas de compostos poliaromáticos apresenta como característica alta abundância do íon molecular e poucos fragmentos de massas. A β -clivagem que leva a formação do íon de m/z 141 (etapa 1) é o principal mecanismo de fragmentação de compostos poliaromáticos alquilados (Figura 30b a 30f). A perda de acetileno a partir do fragmento de m/z 141 leva a formação do íon m/z 115. A facilidade do íon m/z 141 sofrer rearranjo para formação do cátion tropílio (Figura 32) determina sua abundância no respectivo espectro de massas. Assim, o etil-naftaleno (30f) e o 2,3-, (ou 1,2)-dimetil-naftaleno apresentam alta abundância do íon de m/z 141 em seus respectivos espectros de massas, enquanto o 1,4- e o 1,6-dimetil-naftaleno

apresenta baixa abundância deste íon. A alta similaridade dos espectros de massas de diferentes isômeros (dimetil- e etil-naftalenos) fez do índice de retenção uma ferramenta essencial para atribuição das estruturas apresentadas na tabela 6.

Isoprenóides representam a terceira classe de composto identificada na gasolina estudada. O espectro de massas de isoprenóides (Figuras 33 e 34), diferente do que é observado para n-alcanos (Figura 29), que mostram um gradual declínio na abundância dos fragmentos com o aumento da massa, a ramificação leva a quebra deste padrão de fragmentação característico de hidrocarbonetos devido estabilidade do cátion secundário em comparação com o cátion primário.

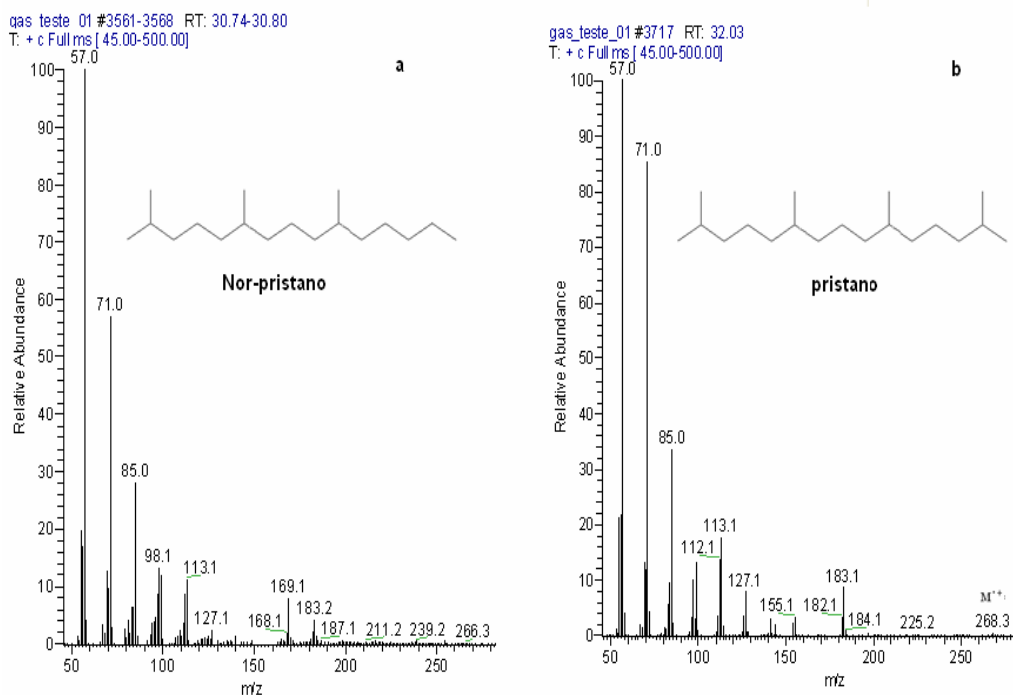


Figura 33. Espectro de massas do nor-pristano (a) e pristano (b).

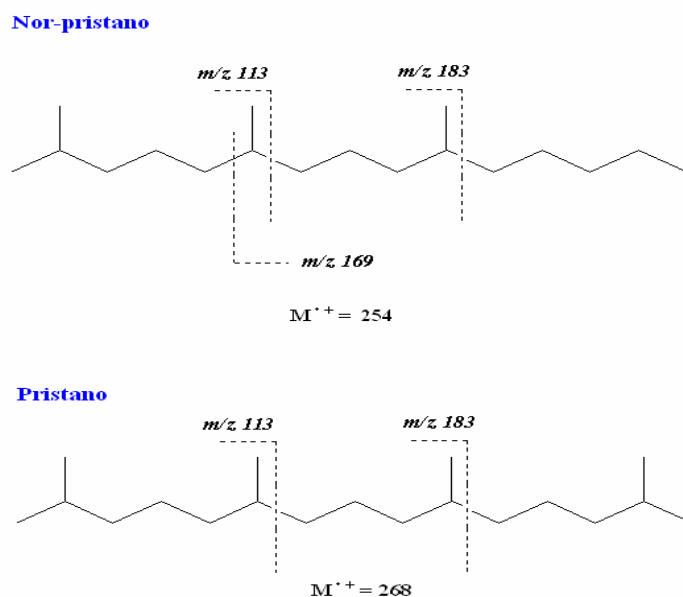


Figura 34. Origem dos fragmentos observados nos espectros de massas do nor-pristano e do pristano.

Observando o perfil cromatográfico referente ao monitoramento do 3º dia da biodegradação de gasolina a 1000 ppm (Figura 28) podem ser identificados os compostos que foram degradados e os que permaneceram recalcitrantes nas condições estabelecidas. A relação dos compostos por tempo de retenção está apresentada na tabela 10.

Tabela 10. Relação dos compostos identificados no *headspace* dos ensaios com gasolina por espectrometria de massa.

Pico (TR min)	IR calculado	IR Literatura	Composto	Massa molar
18.80	-	1210 ^a	Naftaleno	128
21.98	1310	1290 ^b	2-metil-naftalelo	142
22.44	1329	1307 ^b	1-metil-naftaleno	142
24.64	1398	1400 ^c	1-etil-naftaleno	156
24.74	1400	1400	<i>n</i> -Tetradecano	198
24.93	1427	1427 ^b	1,6-dimetil-naftaleno	156
25.32	1443	1443 ^c	1,4-dimetil-naftaleno	156

25.40	1446	-	dimetil-naftaleno (isomero)	156
25.80	1464	-	dimetil-naftaleno (isomero)	156
26.20	1477	1459 ^b	1,2-dimetil-naftaleno ou 2,3-dimetil-naftaleno	156
26.34	1483	1462	2,6,10-trimetil-tridecano	226
27.25	1500	1500	<i>n</i> -Pentadecano	212
29.62	1600	1600	<i>n</i> -Hexadecano	226
30.70	1656	1649 ^d	2,6,10-trimetil-pentadecano	254
31.86	1700	1700	<i>n</i> -Heptadecano	240
32.02	1708	1707	2,6,10,14-tetrametil-pentadecano (pristano)	268
33.99	1800	1800	<i>n</i> -Octadecano	254

Obs.: Estão descritos apenas os compostos em caráter majoritário. ^a(ÁDÁMOVÁ *et al*, 2005); ^b(SANDERCOCK *et al*, 2003); ^c(SONG *et al*, 2003); ^d(KENIG *et al*, 2005).

Com base nos resultados obtidos, percebe-se que os microrganismos presentes no consórcio utilizado tiveram preferência por hidrocarbonetos de cadeia normal C₁₄ a C₁₈: *n*-Tetradecano; *n*-Pentadecano; *n*-Hexadecano; *n*-Heptadecano e *n*-Octadecano (assinalados com asteriscos - Figura 28), visto que, hidrocarbonetos de cadeia linear são mais facilmente biodegradados por microrganismos. Segundo Maeng *et al*, (1996) três mecanismos metabólicos são conhecidos para degradação microbiana de *n*-alcanos: a- monoterminal oxidação comum em *Pseudomonas* spp., b- biterminal oxidação conhecido em várias espécies de fungos e bactérias e c- subterminal oxidação identificado em *Nocardia* spp.. Os compostos aromáticos, como os derivados do naftaleno, apresentam uma maior dificuldade a biodegradação microbiana. A existência de um anel aromático estabiliza a molécula, pois as duplas ligações dão uma alta resistência ao ataque microbiano, além disso, esses compostos aromáticos identificados apresentam uma toxicidade maior aos microrganismos, quando comparados aos hidrocarbonetos de cadeia linear. Os compostos isoprenóides também apresentaram certa recalcitrância quando comparados aos hidrocarbonetos lineares. O pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) por exemplo, é extremamente resistente à biodegradação devido as suas ramificações (RONTANI & GIUSTI, 1996).

Como houve um completo desaparecimento dos compostos presentes no *headspace* no final dos ensaios de biodegradação, não foi identificado subprodutos formados durante o processo.

5.5 INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS DURANTE O PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DA GASOLINA

Para este estudo foi realizada a extração dos componentes totais dos experimentos de biodegradação e controle por extração líquido-líquido. O solvente acetato de etila foi escolhido devido a sua capacidade de extrair compostos de baixa e alta polaridade, permitindo o estudo de uma ampla classe de compostos que inclua os compostos naturais da gasolina e possíveis metabolitos do processo de biodegradação, como por exemplo, aldeídos e álcoois. Este processo de extração foi aplicado a uma batelada de testes monitorados ao longo de um mês sendo coletadas vinte amostras, incluindo ensaios e controle. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A partir da análise obtida não foi observado produtos de biodegradação de rota de metabolismo aeróbio, ou seja, compostos oxidados. A não observação de produtos do metabolismo é um indício que os metabólicos não estão sendo disponibilizados no meio, portanto é provável que esteja ocorrendo à completa mineralização, através do ciclo de Krebs, levando a produção de CO₂ e H₂O, como é observado em bactérias gram-negativas como *Pseudomonas putida* (HAMME et al, 2003).

Maeng et al, (1996) relatam que apesar do significativo consumo de n-alcanos por *Acinetobacter* sp nenhum alceno hidroxilado foi detectado nos extratos celulares, segundo este estudo *Acinetobacter* sp degradam n-alcanos pelo ataque de dioxigenases que levam a formação de hidroperóxidos de n-alquil, que são subsequentemente convertidos a aldeído via perácido. A enzima dioxigenase isolada de *Acinetobacter* sp foi capaz de oxidar alcanos de 10 a 30 átomos de carbono, alcenos (C₁₂ a C₂₀) e alguns compostos aromáticos alquilados, mas não alcanos ramificados como os isoprenóides.

5.6 INVESTIGAÇÃO DA POTENCIALIDADE DE UM CONSÓRCIO DE MICRORGANISMO DEGRADADOR DE EUGENOL PARA DEGRADAR BTXs

Em um estudo que avaliava consórcios de microrganismos para a biotransformação de eugenol¹ (que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang C. Pfeiffer da Universidade Federal de Rondônia-UNIR) foi selecionado um consórcio capaz de rapidamente biodegradar este substrato. Devido ao eugenol ser composto monoaromático isto despertou a expectativa deste consórcio apresentar potencial para biodegradar outros compostos monoaromáticos, como os BTXs. Entretanto, quando o BTXs foi utilizado como única fonte de carbono, não foi observado o crescimento do consórcio de microrganismos o que indica que estes compostos não foram utilizados como fontes de carbono por este microrganismo, podendo também serem tóxicos para estes microrganismos. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Maeng et al, (1996) que indica que a dioxigenase de *Acinetobacter* sp e capaz de oxidar compostos aromáticos alquilados (como eugenol).

¹ Este estudo e resultados fazem parte do projeto de pesquisa de iniciação científica de Leidiane C Lauthartte – PIBIC – UNIR.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho investigou o desempenho do referido consórcio frente à degradação de gasolina e diesel tendo produzido importantes informações para o emprego prático deste consórcio. Os resultados finais mostram que os consórcios MCD₇ e MCG₇ biodegradam os componentes do diesel e gasolina, respectivamente. Durante o monitoramento foi observado a degradação para os compostos presentes na faixa de destilação da gasolina e do óleo diesel, ambos a uma concentração de 1000 ppm.

Percebe-se que os microrganismos de ambos os consórcios tiveram uma preferência por hidrocarbonetos lineares: *n*-Dodecano, *n*-Tridecano, *n*-Tetradecano, *n*-Pentadecano, *n*-Hexadecano e *n*-Heptadecano.

O pristano apresentou-se resistente à biodegradação devido às suas ramificações, enquanto que o composto identificado como 1,6-dimetil-naftaleno, apesar de ser um composto aromático, foi degradado pelo consórcio MCD₇ após 21 dias de monitoramento.

De acordo com o sequenciamento e os testes bioquímicos o microrganismo *Acinetobacter Baumannii* foi detectado nas amostras de água residuária coletada nas proximidades de uma distribuidora de combustíveis da cidade de Porto Velho – RO.

Este trabalho é uma contribuição direta para o desenvolvimento regional de Porto Velho, na área ambiental, agrupando um conjunto de técnicas e desenvolvimento científico para aplicação de biodegradação.

7. SUGESTÕES

- Isolar e identificar microrganismos que participam da biodegradação de gasolina;
- Realizar ensaios de biodegradação com o microrganismo isolado do consórcio MCD₇ (*Acinetobacter Baumannii*) e comparar com os estudos de biodegradação realizados com o consórcio MCD₇;
- Realizar ensaios de biodegradação com outros petroderivados utilizando o microrganismo isolado;
- Devido à grande toxicidade de compostos BTXs, é de extrema importância estudos de biodegradação no intuito de avaliar a eficiência da *Acinetobacter Baumannii* frente a estes poluentes;
- Montagem de um bioreator para avaliar a eficiência da biodegradação em um macro-sistema

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁDÁMOVÁ, M.; ORINÁK, A.; HALÁS, L. Retention indices as identification tool in pyrolysis capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1087, 131-141. (2005).
- ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, 2.ed. (1994).
- AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and nalkane degradation within Omani crude oil and a mousse. *Marine Pollution Bull.*, v.30, n.6, p. 403-408. (1995).
- ALVAREZ, P. J. J.; ANID, P. J.; VOGEL, T. M. Kinetics of aerobic biodegradation of benzene and toluene in sandy aquifer material. *Biodegradation* v. 2, p. 43-51. (1991).
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Anuário estatístico 2006. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: set. 2008. (2006).
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Anuário estatístico 2008. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: set. 2008. (2008).
- ATLAS, R.M. Microbiology: Fundamentals and Applications. 2nd. Ed. MacMillan Publishing Company, New York. (1988).
- AUGUSTO, F.; VALENTE, A.L. Applications of Solid-Phase Microextraction to Chemical Analysis of Live Biological Samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 428. (2002).
- AUGUSTO, F.; VALENTE, A.L. Microextração em fase sólida (SPME - Solid Phase Microextraction). *Química Nova*, São Paulo, SP, v. 23, n. 4, p. 523-530. (2000).
- BAILEY, N. J. L.; JOBSON, A. M.; ROGERS, M. A. Bacterial degradation of crude oil: Comparison of field and experimental data. *Chemical Geology*, v.11, p. 203-221. (1973).
- BANERJEE, S.; YALKOWSKY, S. Cosolvent-Induced Solubilization of Hydrophobic Compounds into Water. *Analytical Chemistry*, v. 60, p. 2153-2155. (1988).
- BARKER, K. H.; HERSON, S. Bioremediation. New York. McGraw-Hill, inc. 375p. (1994).
- BERNETH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P. E RHODES, S. “ Biotechnologies For Remediation and Pollution Control in the Mining Industry”. *Minerals & Metallurgical Processing*, 17 (2), 105-111. (2000).
- BERTRAND, J. C.; RAMBELOARISOA, E.; RONTANI, J. F.; GIUSTI, G.; MATTEI, G. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnology Letters*, v.5, p. 567-572. (1983).
- BORDEN, R. C. Natural bioremediation of hydrocarbon-contaminated ground water. Em: *Handbook of Bioremediation*. CRC Press, Boca Ratón, FL. Pp. 177-199. (1994).

BORDEN, R.C., GOMEZ, C.A. & BECKER, M.T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. *Groundwater*, 33, 180 – 189. (1995).

BRITON, L. Microbial Degradation of Aliphatic Hydrocarbons in: “Microbial Degradation of Organic Compounds”. New York. D. T. Gibson ed. Marcel Dekker, Inc. p. 89-129. (1984).

BROWN, R. A.; HICKS, R. J.; HICKS, P. M. Use of Air Sparging for In-Situ Bioremediation. Em: *Air Sparging for Site Remediation*: Lewis Publishers, Inc., p. 38-55. (1994).

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.*, v. 41, p. 653-673. (1941).

CARASEK, R. Uso de Um Novo Método de Agitação para Microextração em Fase Sólida – SPME – na Determinação de Fenóis em Água. Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis. (2002).

CHAI, C.H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDUT, J. Comparation of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperature agricultural soil. *Sci. Total Envirom.*, v.227, n.2/3, p.237-247. (1999).

CHAPELLE, F.H., *Groundwater Microbiology and Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York. (1993).

CHEN, Y. M.; ABRIOLA, L. M.; ALVAREZ, P. J. J.; VOGEL, T. M. Biodegradation and transport of benzene and toluene in sandy aquifer material: model experiment comparisons. *Wat. Resour. Res.*, v. 28, p. 1833-1847. (1992).

CHIANG, C. Y.; SALANITRO, J. P.; CHAI, E. Y.; COLTHART, J. D.; KLEIN, C. L. Aerobic biodegradation of benzene, toluene and kylene in a sand aquifer: data analysis and computer modeling. *Ground Water Monitoring Remote and Remediations*, Dublin, v. 27, n. 6, p. 823-834. (1989).

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), Resolução CONAMA nº 357/2005. Brasília. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2007. (2005).

CORSEUIL, H. X.; FERNANDEZ, M. Co-Solvency Effect in Aquifers Contaminated with Ethanol Amended Gasoline. Dep. Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. (1999).

CORSEUIL, H. X.; WEBWR, W.J., JR., Potential biomass limitations on rates of degradation of mono aromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface Soils, *Wat. Res.*, 28, 1407 – 14. (1994).

CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J., Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: Effect of ethanol, 18th Bienal International Conference & Exhibition, Singapore. (1996).

CORSUEL, H. X.; MARTINS, M. D. Contaminação de Águas Subterrânea por Derramamento de Gasolina: O Problema é Grave? In: *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Vol. 2, No. 2, Abril/Junho. (1997).

- CRYSTAL, A.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction With Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Analytical Chemistry*. (1990).
- CRYSTAL, A.; PRATT, K.; MOTLAG, S.; PAWLISZYN, J. *High Resolut. Chromatogr.* (1992).
- CUNHA, C. D. Avaliação da biodegradação de gasolina em solo. Dissertação de Mestrado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, 95p. (1996).
- EPA, U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY A Citizen's guide to natural attenuation, United States Environmental Protection Agency, Report EPA 542-F-96-015. (1996).
- FRANKENBERGER, Jr., W. T. The need for a laboratory feasibility study in biodegradation of petroleum hydrocarbons. In.: CALABRESE, E. J.; KOSTECKI, P. T. *Hydrocarbons contaminated soils and groundwater*, v.2. Chelsea: Lewis Publishers; p. 237-293. (1992).
- GALEGO, L. L.; LOREDO, J. LLAMAS, J. F.; VAZQUEZ, J.; SANCHEZ, J. Biodegradation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, v.12, n.5, p. 325-335. (2001).
- GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotech. Bioeng.*, v. 27, p. 660-674. (1985).
- GUTNICK, D. C.; ROSENBERG, E. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. *Annual Rev. Microb.*, v.31, p.379-396. (1977).
- HAMME, J. D. V., SINGH, A., WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67:503-549. (2003).
- IACONO, M.; VILLA, L.; FORTINI, D.; BORDONI, R.; IMPERI, F.; BONNAL, R. J.; SICHERITZ-PONTEN, T.; DE BELLIS, G.; VISCA, P.; CASSONE, A.; CARATTOLI, A. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Journal Antimicrob. Agents Chemother.* Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. (2008).
- JOHNSON, P. C., Assessment of the contribution of volatilization and biodegradation to in situ air sparging performance, *Environ. Sci. Technol.* 32: 276-281. (1998).
- KADRI, M. H., SALEM, A. A., SALMA, M. Oil degrading bacteria in Kuwait Bay. *J. Marine Sci.*, v. 15, p.50-51. (1986).
- KAIPPER, B. I. A. Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 179p. (2003).
- KALLIO, M.; JUSSILA, M.; RISSANEN, T.; ANTTILA, P.; HARTONEN, K.; REISELL, A.; VREULS, R.; ADAHCHOUR, M.; HYOTYLAINEN, T., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry in the identification of organic compounds in atmospheric aerosols from coniferous forest*, *J. Chromatogr. A*, 1125, 234-243. (2006).

- KAO, C. M.; CHEN, S. C.; LIU, J. K.; WANG, Y. S. Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. *Water Residual*, Vol. 35, No. 8, 1951-1960. (2001).
- KAPLAN, I. R.; GALPERIN, Y.; LU, S.; LEE, R. Forensic environmental geochemistry: Differentiation of fuel-types, their sources and release time. *Org. Geochem.*, v. 27, p. 289-317. (1997).
- KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduos oleosos de refinarias de petróleo por microrganismos isolados de “*lanforming*”. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Rio Claro-SP. 202p. (2001).
- KENIG, F.; SIMONS, D.-J.H.; CRICH, D.; COWEN, J.P.; VENTURA, G.T.; REHBEIN-KHALILY, T., Structure and distribution of branched aliphatic alkanes with quaternary carbon atoms in Cenomanian and Turonian black shales of Pasquia Hills (Saskatchewan, Canada), *Org. Geochem.*, 36, 117-138. (2005).
- KONIG, W.A.; JOULAIN, D.; HOCHMUTH, D.H., GC/MS Library: Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. (2006).
- LEAHY, L. L.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, v. 54, p. 305-315. (1990).
- LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. Relatório final. Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais e Instituto de Biologia. Unicamp, Campinas, SP. Disponível em: <[www.mma.gov.br/ port/sbf/chm/relpub.html](http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/relpub.html)>. Site acessado em novembro de 2007. (2000).
- LINKFIELD, T.G., SUFLITA, J.M.; TIEDJE, J.M. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of chloro benzoates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2773 – 2778. (1989).
- LOPES, A.L.; VALENTE, A.L. ; AUGUSTO, F. Microextração em Fase Sólida, *Analytica*, 2, 25. (2002).
- LUZ, C. C. Avaliação de metodologia para quantificação de derivados de petróleo, btex, em solo e sedimentos por microextração em fase sólida (SPME). Monografia de final de curso. Departamento de Química, Núcleo de Ciências e Tecnologia, UNIR. (2006).
- MACEDO, R. C.; BERBERT, V. H. C.; LEMOS, J. L. S. Trabalho apresentado na X jornada de iniciação científica. Disponível em: <www.cetem.gov.br> . Site acessado em novembro de 2007. (2002).
- MACGILLIVRAY, B. Headspace Solid-Phase Microextraction Versus Purge and Trap for the Determination of Sustituted Benzene in Water, *Journal of Chromatography Science*, 32, 317, (1994).
- MACKAY, D.; SHIU, W. Y.; MA, K. C. Illustrated handbook of Physical-Chemical Properties and environmental fate for organic chemicals, Lewis. (1998).

- MAENG, J. H., SAKAI, Y., TANI, Y., KATO, N. Isolation and Characterization of a Novel Oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. Strain M-1. *Journal of Bacteriology*, 3695-3700. (1996).
- MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Rio Claro-SP. 162p. (2006).
- MELLO, J. M. M.; GUELLI U. SOUZA, S. M. A.; BRANDÃO, H. L.; SILVA, A.; SOUZA, A. A. U. Simulação Numérica do Benzeno em um Reator de Leito Fluidizado. *Rio Oil & Gás* 2006. Anais em CD, Rio de Janeiro, Brasil. (2006).
- MENDES, R. Exposição ocupacional ao benzeno e seus efeitos sobre a saúde dos trabalhadores. *Revista da Associação Médica do Brasil*. v. 39, p.249-256. (1993).
- MILLER, A. D. Remediação de fase livre de gasolina por bombeamento duplo: Estudo de caso. Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 133p. (2001).
- MISHRA, S.; SARMA, P. M.; LAL, B. Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter Baumannii* strain its survival in crude oil-contaminated soil microcosm. *FEMS Microbiology Letters* 235, 323-331. (2004).
- MORAIS, E. B.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Crescimento de bactérias isoladas de solo em gasolina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 71, (Supl.), 1-749. (2004).
- OLIVEIRA, F. J. S. Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru. Tese Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 110 p. (2001).
- OMORI, A. T. Derivados Aromáticos de Selênio e Telúrio. Aplicação de Biocatálise na Preparação de Selenetos e Teluretos Aromáticos Enantiomericamente Enriquecidos. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 180p. (2005).
- PAUL, E.A. & CLARCK, F.G. *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press. (1989).
- PAWLISZYN, J. *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*. Elsevier. Amsterdam. (2002).
- PAWLISZYN, J. *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*. Wiley – VCH Inc. New York. 12 p. (1997).
- PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. *Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo*. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, Governo da Bahia, Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia, Salvador, 229 p. (2002).

POTTER, T. L.; SIMMONS, K. E. Composition of petroleum mixtures. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Massachusetts: Amherst Scientific Publishers. v. 2. (1998).

POULSEN, M.; LEMON, L.; BARKER, J. Dissolution of Monoaromatic Hydrocarbons into Groundwater from Gasoline – Oxigente mixtures. Environ. Sci. Technol., Vol. 26, p. 2483-2489. (1992).

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. (2007).

RIBEIRO, F. A. L. Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. (2001).

RIDGEWAY, H.F., SAFARIK, J., PHIPPS, D., CARL, P.; CLARK, Identification and catabolic activity of well-derived gasoline degrading bacteria from a contaminated aquifer. Appl. Environ. Microbiol., 56, 3565 – 3575. (1990).

RONTANI, J. F.; GIUSTI, G. Study of the Biodegradation of Polybranched Alkanes by Marine Bacterial Community. Marine Chemistry. V.20. p. 197-205. (1996).

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. In: Microbiologia Ambiental. Ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-CNPMA). Jaguariúna-SP, p. 307-334. (1997).

SAKATA, S. K.; TANIGUCHI, S.; RODRIGUES, D. F.; URANO, M. E.; WANDERMUREN, M. N.; PELLIZARI, V. H.; COMASSETO, J. V. Development of a static headspace gás chromatographic/mass spectrometric method to analyze the level of volatile contaminants biodegradation. Journal of Chromatography A, v. 1048, 67-71. (2004).

SANDERCOCK, P.M.L.; DU PASQUIER, E., Chemical fingerprinting of unevaporated automotive gasoline samples, Forensic Sci. Int, 134, 1-10. (2003).

SEEGER, M.; TIMMIS, K.; HOFER, B. Bacterial Pathways for the Degradation of Polychlorinated Biphenyls. Marine Chemistry. V.58. p. 327-334. (1997).

SHAMSHOOM, S. M.; ZIARA, T. S.; ABDUL-RITHA, A. N.; YACOUB, A. E. Distribution of oil bacteria in the north-west Arabian Gulf. Mar. Pollut. Bull., v. 21, p.38-40. (1990).

SHANNON, M. A., BOHN, P. W., ELIMELECH, M., GEORGIADIS, J. G., MARIÑAS, MAYES, A. M. Science and technology for water purification in the coming decades. Nature, V. 452. p. 301- 310. (2008).

SILVA, R. Preparo de Fibras para Microextração em Fase Sólida (SPME) com Recobrimento á Base de Poliglicóis, Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas – SP. (2005).

SILVERMAN, R. B. The Organic Chemistry of Enzyme- catalized Reactions. Academic Press: San Diego. (2002).

SONG, C.; LAI, W.-C.; MADHUSUDAN REDDY, K.; WEI, B., Chapter 7. Temperature-programmed retention indices for GC and GC-MS of hydrocarbon fuels and simulated distillation GC of heavy oils in Analytical advances for hydrocarbon research, Hsu, C.S., ed(s), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 147-193. (2003).

SORIANO, A.U., “Tratamento de solos argilosos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo”. Relatório de Atividades Apresentado ao CNPq, para Renovação de Bolsa Modalidade RD, Processo nº 300479/99-9, Área - Engenharia Química (cadastro na biblioteca do CETEM/MCT como Relatório Técnico - RT43/2000). (2000).

SORKHOH, N. A.; GHANNOUM, M. A.; IBRAIM, A. S.; STRETTON, R. J.; RADWAN, S. S. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochous* isolated from soil and marine environment in Kuwait. Environ. Pollution, v. 65, p.1-17. (1990).

SPINELLI, L. F. Biorremediação, toxicidade e lesão celular em derrames de gasolina. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, 218 p. (2005).

SUPELCO CO. SPME Fiber Assortment kit 2 For Manual Holder, 24GA. Bellefonte, PA – USA. (1999).

TAUK, S.M. Biodegradação de Resíduos Orgânicos no Solo. Revista Brasileira de Geociências, 20(1-4):299-301.(1990).

TIBURTIUS, E. R. L. PERALTA-ZAMORA, P. LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. Rev. Química Nova, v.27, n.3, p. 441-446. (2004).

TRINDADE, P.V.O. Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p. (2002).

TROQUEST, J., LARROCHE, C. e DUSSAP, C.G. “Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation” Biochemical Engineering Journal, 13, 103-112. (2003).

TROVÃO, R. S. Análise ambiental de solos e águas subterrâneas contaminados com gasolina: Estudo de caso no município de Guarulhos – SP. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo-SP. 157p. (2006).

URARAHY, A. F. P.; MARINS, M. D. M.; VITAL, R. L.; GABARDO, I. T.; PEREIRA, Jr. Effect of Aeration Biodegradation of Petroleum Waste. Ver. Microbiol. V.29 n.4. São Paulo. (1998).

URURAHY, A. F. P. Biorremediação de Resíduos Oleoso Proveniente de Refinaria. Tese de Doutorado em Ciências. Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro. (1998).

VAN BELIEN, J. B., LI, Z., DUETZ, W. A., SMITS, T. H. M., WITHOLT, B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil & Gas Science and Technology, 58, 427-440. (2003).

VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. *Can. J. Microbiol.*, Vol. 41, pp.767-775, (1995).

VITAL, N. Formação de emulsificantes por *Cândida guilliermondii* T9 a partir de querosene. Dissertação de Mestrado. Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ. (1992).

WANG, Z.; FINGAS, M.; PAGE, D. S. Oil spill identification. *Journal of Chromatography A*, V. 843, p. 369-411. (1999).

WEBER, W. J. Jr; CORSEUIL, H. X. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Wat. Res.*, v.28, p.1407-1414. (1994).

WILSON, K. Preparation of genômico DNA from bacteria, in *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, R, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA & Struhl, K eds), Wiley, John & Sons, Inc., New York. (1989).

YAMADA, H.; SHIMIZU, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 622. (1988).

YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of aromatic compounds. Em: *Microbial degradation of aromatic compounds*. GIBSON, D. T. (ed.). Marcel-Dekker-Inc., New York, pp. 487-523. (1984).

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. *Headspace Solid- Phase Microextraction, Analytical Chemistry*. (1993).